3247

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD CENTRE D'ORSAY

pour l'obtention du

DOCTORAT DE 3e CYCLE

SPECIALITE : ENDOCRINOLOGIE ET DEVELOPPEMENT

par

Fergus SWEENEY

ETUDE DES POUVOIRS METASTATIQUES DE TREIZE LIGNEES CLONEES D'UN RHABDOMYOSARCOME INDUIT PAR INJECTION INTRAMUSCULAIRE DE NICKEL CHEZ LE RAT.

SOUTENUE LE 18 JUIN 1982 devant la Commission d'Examen

MM	ROFFI	Président
	M.F. POUPON	Rapporteur
	P. BURTIN	Examinateurs
	Th. LENDER	
	I. CHOUROULINKOV	

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD CENTRE D'ORSAY

pour l'obtention du

DOCTORAT DE 3^{e} CYCLE

SPECIALITE : ENDOCRINOLOGIE ET DEVELOPPEMENT

par

Fergus SWEENEY

ETUDE DES POUVOIRS METASTATIQUES DE TREIZE LIGNEES CLONEES D'UN RHABDOMYOSARCOME INDUIT PAR INJECTION INTRAMUSCULAIRE DE NICKEL CHEZ LE RAT.

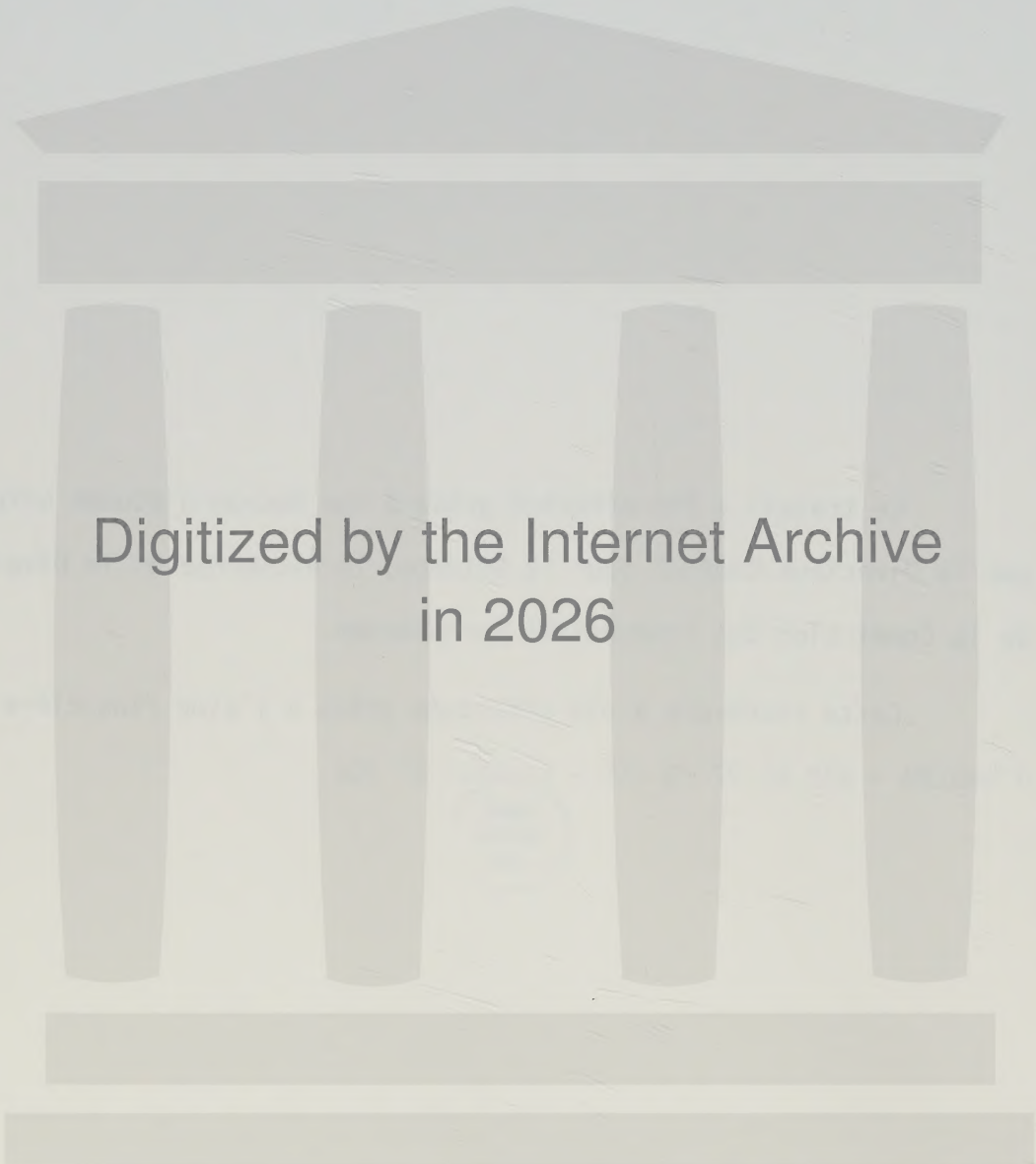
SOUTENUE LE 18 JUIN 1982 devant la Commission d'Examen

MM	ROFFI	Président
	M.F. POUPON	Rapporteur
	P. BURTIN	Examinateurs
	Th. LENDER	
	I. CHOUROULINKOV	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été effectué grâce à une Bourse d'études offerte par le Directeur Général pour la Science, la Recherche et le Développement de la Commission des Communautés Européennes.

Cette recherche a été effectuée grâce à l'aide financière de l'INSERM - ATP N° 77-79-109 - Contrat N° 002.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547321_0005

Ce travail de recherche a été effectué à l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer à VILLEJUIF, dans le Laboratoire de Médecine Expérimentale, dirigé par le Docteur Ivan CHOUROULINKOV, *Maître de Recherche au C.N.R.S. et c'est pour moi un agréable devoir de lui exprimer ici ma profonde gratitude.*

Je remercie sincèrement Monsieur ROFFI, *Professeur à l'Université de Paris XI, Orsay, qui m'a fait le très grand honneur de bien vouloir accepter la Présidence de ce jury.*

Qu'il trouve ici l'expression de mes sentiments respectueux et reconnaissants.

Je voudrais remercier le Docteur Pierre BURTIN, *Directeur de Recherche au C.N.R.S. qui a accepté de faire partie de ce jury.*

Il m'a conseillé avec bienveillance et je lui en suis très reconnaissant.

C'est avec grand plaisir que je voudrais remercier le Docteur Marie-France POUPON, *Chargée de Recherche à l'INSERM qui m'a fait l'honneur d'être le rapporteur de cette thèse qu'elle à suivie dans le détail. Ses encouragements et ses conseils m'ont été précieux.*

Qu'elle soit assurée de ma reconnaissance.

Monsieur Th. LENDER, *Professeur à l'Université Paris-Sud, Orsay, qui a bien voulu faire partie de ce jury.*

Qu'il en soit infiniment remercié.

Je voudrais témoigner toute mon amitié et toute ma symphatie à tous ceux qui m'ont aidé dans ce travail et notamment : Annette DUVERGER, Renée GRASSOT, Georges RENAULT et Jacques POT-DEPRUN *pour leur aide technique efficace, et* Marie-Thérèse MAUNOURY *pour l'analyse statistique de certains résultats.*

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'exécution de cette thèse, et en particulier Madame Françoise MAUGAIN, *Secrétaire qui s'est chargée de la réalisation matérielle et* Madame Laetitia GUGLIELMI *qui s'est chargée de la dactylographie de l'article ci-joint.*

Avant l'exposer ce travail, il est une tâche agréable dont je dois m'acquitter en exprimant ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu durant ces recherches pendant mon séjour en France.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ

INTRODUCTION 5

- Objectifs de cette Thèse 15

MATERIEL ET MÉTHODES

- PROVENANCE DES PRODUITS 18
- ENTRETIEN DES CELLULES 19
- ORIGINE DES CELLULES TUMORALES 20
  - . La tumeur primaire
  - . La lignée cellulaire parentale 9-4/0
  - . Les lignées cellulaires clonées, F 9-4/6 à F 9-4/25
- CARACTERISATION *IN VIVO* 21
  - . Injections sous-cutanées
  - . Injections intraveineuses
- CARACTERISATION *IN VITRO* 23
  - . Courbes de croissances
  - . Efficacité de clonage
  - . Morphologie
  - . Caryotypes
  - . Sensibilité au détachement par la trypsine

.../...

. Etude de la fibronectine *in vitro* par immunofluorescence

. Préparation des anti-sérums antifibronectine de rat

RESULTATS

- CARACTERISATION *IN VIVO* 29

TUMORIGENICITE ET CROISSANCE APRES INJECTION SOUS-CUTANEE DE CELLULES 29

. La lignée parentale

. Les lignées clonées

LA CAPACITE METASTATIQUE SPONTANEE APRES INJECTION S.C. DES CELLULES 32

. La lignée parentale

. Les lignées clonées

LES METASTASES EXPERIMENTALES PROVOQUEES PAR INJECTION INTRAVEINEUSE DE CELLULES 35

. La lignée parentale

. Les lignées clonées

HISTOLOGIE 36

. Tumeur originale

. Tumeurs sous-cutanées après injection de cellules

. Colonies pulmonaires après injection i.v. de cellules

- CARACTERISATION *IN VITRO* 38

LES COURBES DE CROISSANCE 38

LA MORPHOLOGIE 39

CARYOTYPES 39

LA SENSIBILITE AU DETACHEMENT PAR LA TRYPSINE 40

.../...

LA FIBRONECTINE 41

EFFICACITE DE CLONAGE 42

- RELATIONS ENTRE LES DIVERS CARACTERES ETUDIES *IN VIVO* ET *IN VITRO* 43

TABLEAUX 46

FIGURES 55

PLANCHES 61

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE 65

BIBLIOGRAPHIE 81

RESUME

Ce travail concerne le phénomène métastatique. La relation entre la capacité métastatique spontanée et la capacité métastatique expérimentale est étudiée, ainsi que les liaisons entre ces caractères et un nombre de paramètres définis *in vitro*.

Dans ce but treize lignées ont été isolées par clonage en milieu liquide d'une culture d'un rhabdomyosarcome primaire induit par injection i.m. de nickel chez le rat. *In vivo* ces lignées ont été injectées par voie s.c. et par voie i.v. Les caractères suivants ont été étudiés *in vivo* :

après injection s.c.

- la tumorigénicité
- la croissance des tumeurs
- la capacité métastatique.

après injection i.v.

- la capacité colonisante au niveau des poumons.

La tumorigénicité était hétérogène parmi les lignées, la DT 50 variant de < 1 000 à > 10 000 cellules. La croissance était divisée en deux phases. La première durait du jour de l'injection jusqu'à l'apparition d'une tumeur de 15 mm de diamètre, la durée de cette phase variait d'une lignée à l'autre (32-93 jours). La deuxième phase qui exprime le temps nécessaire à la croissance d'une tumeur d'un diamètre de 15 mm jusqu'à un diamètre de 30 mm, était peu variable (21-34 jours). En moyenne, les lignées très tumorigènes se sont développées plus vite que les lignées peu tumorigènes.

Les métastases se trouvaient aux ganglions lomboaortiques, inguinaux, axillaires, médiastinaux et aux poumons. La tumeur primaire a provoqué des métastases aux mêmes endroits. La relation entre le pourcentage de rats par lignée avec métastases lomboaortiques et le nombre moyen par lignée de métastases apparentes à la surface des poumons, est directe et significative ($p < 0,05$ χ^2 de Yates).

La capacité colonisante après injection i.v. de cellules permet de répartir les lignées en deux groupes : peu colonisantes : 8 lignées et très colonisantes : 5 lignées.

Il existe une relation inverse entre la capacité colonisante des lignées et leur capacité métastasiante. Cette relation n'est pas significative dans le cas des métastases pulmonaires mais elle est vérifiée par la liaison entre les métastases lomboaortiques et les colonies pulmonaires qui est significative ($p < 0,01$ χ^2 de Yates).

In vitro les caractères suivants ont été étudiés :

. l'expression d'une matrice extracellulaire de fibronectine (étude par immunofluorescence)

. la sensibilité au détachement sous l'influence de la trypsine

.../...

. la différenciation en myotubules

. la croissance

. le caryotype

Tòus ces caractères étaient hétérogènes d'une lignée à l'autre mais seuls certains d'entre eux sont liés aux caractères étudiés *in vivo*.

Il existe une relation entre la quantité estimée de fibronectine et la capacité colonisante. Les lignées qui avaient une matrice extracellulaire de fibronectine peu développée ont induit peu de colonies pulmonaires.

Les métastases spontanées semblent moins influencées par la quantité de fibronectine estimée *in vitro*. Toutefois, chez plus de 50 % des rats, les quatre lignées pauvres en fibronectine ont une haute incidence de métastases lomboaortiques. Trois des quatre lignées très riches en fibronectine ont une faible incidence de métastases lomboaortiques.

Les quatre lignées pauvres en fibronectine se trouvaient parmi les plus tumorigènes.

La relation entre la capacité colonisante et la quantité de fibronectine estimée *in vivo* peut s'expliquer par une capacité accrue des cellules riches en fibronectine *in vitro*, d'accumuler la fibronectine plasmatique de l'hôte quand elles sont injectées par voie i.v.

Une relation existe entre le nombre moyen de chromosomes de chaque lignée et la durée de la première phase de croissance. Les lignées ayant un grand nombre de chromosomes se sont développées rapidement. Ce phénomène est peut être dû à une instabilité génétique de ces lignées.

L'étude d'une série de lignées clonées d'une même tumeur, hétérogènes quant à leurs pouvoirs malins, permet *in vitro* ou *in vivo* la recherche de caractères liés à leur malignité. La mise en évidence de la relation inverse entre la capacité métastatique spontanée (après la croissance d'une tumeur) et la capacité colonisante (après injection i.v. de cellules) montre

que l'extrapolation des résultats obtenus par injection i.v. de cellules pour l'explication du processus métastatique spontané ne peut se faire qu'avec précaution. Les résultats obtenus par l'étude de la fibronectine indiquent que ce caractère mérite une attention approfondie en particulier pour déterminer le rôle de la fibronectine dans la dissémination métastatique spontanée.

INTRODUCTION

Les métastases représentent un des plus difficiles problèmes dans la thérapeutique de la maladie néoplasique. Beaucoup de malades présentant des tumeurs cliniques au moment du diagnostic ont des métastases. Dans ce cas, les interventions les plus efficaces au niveau de la tumeur ne peuvent pas prévenir l'évolution de la maladie (1).

Une métastase est un foyer de cellules tumorales qui survient d'une façon non contiguë et souvent éloignée de la tumeur d'origine après dissémination de cellules à partir de la tumeur primaire. Ces métastases sont souvent inaccessibles à la chirurgie du fait de leur nombre ou de leur site anatomique. Les métastases sont aussi difficiles à déceler précocement lorsqu'elles sont constituées d'un petit nombre de cellules et elles peuvent de plus subsister dans un état plus ou moins dormant pendant très longtemps (2).

Identifier les propriétés particulières des cellules métastasiantes pourrait permettre de savoir pourquoi une cellule s'échappe de la tumeur

.../...

primaire, quels sont les systèmes de l'hôte qui interviennent pour faciliter cet échappement ou l'empêcher et donc, finalement, de tenter d'imaginer un ou des traitements auxquels les métastases pourraient être sensibles. Les cellules qui forment des métastases sont-elles identiques aux cellules de la tumeur primaire ou ont-elles des propriétés particulières qui leur permettent de métastaser ?

Il a été démontré que les populations cellulaires des tumeurs sont souvent hétérogènes. Cette hétérogénéité a été trouvée pour beaucoup de caractères. Des variations ont été observées dans la différentiation (4), le caryotype (5, 6), la tumorigénicité (7), la sensibilité à des agents cytotoxiques (3, 8), les antigènes (9) et la densité des cellules (5, 7, 10).

NOWELL (11) propose qu'une tumeur serait issue d'une seule cellule mais qu'au cours de son développement des sous-clones apparaîtraient. L'apparition de ces sous-clones serait due à une instabilité génétique des cellules. Ces nouvelles populations de cellules soumises à divers facteurs de sélection ne se développeraient pas ou ayant acquis une propriété leur donnant un avantage sélectif elles se développeraient pour former une zone de cellules différentes dans la tumeur. Des sélections consécutives de cellules tumorales par leur pouvoir de croissance, leur résistance à la surveillance immunitaire et leur capacité d'envahir les tissus normaux, conduiraient au développement d'une tumeur de plus en plus maligne. Cette sélection conduirait comme dans les théories classiques de l'évolution à la survie des cellules mieux adaptées. De la même façon, apparaîtraient des populations de cellules ayant une capacité métastatique plus élevée.

Afin de savoir si les cellules qui métastasent peuvent être sélectionnées, FIDLER (12) a entrepris l'expérience suivante. Il a fait des

injections intraveineuses de cellules du mélanome B16 chez les souris syngéniques C57Bl/6. Deux semaines plus tard, il a prélevé des colonies pulmonaires et les a mises en culture. Cette lignée est appelée B16F1. Il a injecté cette lignée (B16F1) et il a mis les colonies pulmonaires en culture ce qui a donné la lignée B16F2. En continuant de la même façon il a produit dix lignées de B16F1 à B16F10. Ces lignées ont une capacité colonisante croissante de B16F1 à B16F10. Le B16F10 ne donne des colonies tumorales qu'aux poumons tandis que le B16F1 en donne aux poumons mais aussi dans d'autres sites. Ces expériences démontrent qu'une sélection peut donner lieu à une population de cellules plus métastasiantes. Ces expériences démontrent aussi que les cellules ont besoin de caractères particuliers pour former des métastases.

Il faut préciser ici que les foyers de cellules tumorales qui sont formés après injection intraveineuse sont appelés colonies ou métastases expérimentales. L'injection des cellules par d'autres voies, (par exemple sous-cutanée ou intra-musculaire) qui entraine la formation d'une tumeur, donne lieu à des métastases spontanées par dissémination de cellules à partir de cette tumeur.

La deuxième question qui se posait était de savoir si des sous-populations à capacités métastatiques différentes pourraient coexister dans une tumeur. FIDLER et KRIPKE (13) ont isolé des lignées clonées à partir d'une tumeur du mélanome B16. Ils ont injecté ces lignées clonées et la lignée parentale par voie intraveineuse. Leurs résultats démontrent qu'il y avait dans la tumeur des cellules de capacités colonisantes très variées.

Le mélanome B16 est une tumeur qui est apparue spontanément en 1954. On peut craindre que les nombreux passages *in vivo* ou *in vitro* aient fait apparaître des populations variantes. KRIPKE, GRUYS et FIDLER, (14) ont alors cloné une tumeur d'origine plus récente, le fibrosarcome 2237, induit par irradiation UV chronique d'une souris C3H femelle. Utilisant ces clones ils ont trouvé une hétérogénéité semblable à celle observée pour le B16 après injection par voie i.v. Ils ont aussi montré qu'il y a une corrélation directe entre la capacité colonisante après injection i.v. et la capacité métastasiante spontanée (tout aussi hétérogène) après injection s.c. Ils considèrent que la capacité colonisante est, au moins pour ce modèle, une bonne approximation de la capacité métastasiante.

Une cellule doit, pour former une métastase, passer plusieurs étapes et chacune lui demande des capacités particulières. Elle doit d'abord se dissocier de la tumeur, pénétrer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Emportée par la sang ou la lymphe, la cellule doit s'attacher aux parois du vaisseau, sortir et, une fois installée, se multiplier pour former une métastase. La littérature sur les métastases est considérable. Quelques revues qui traitent de ce problème sont indiquées dans les références (55, 56).

Deux moyens utiles à l'étude de ce phénomène sont , premièrement la comparaison des caractères des cellules de tumeurs très métastasiantes et des cellules de tumeurs peu métastasiantes et, deuxièmement, la sélection de cellules ayant des caractères particuliers afin de voir si l'acquisition de ces caractères provoque une augmentation de la capacité métastasiante.

BANIYASH et al., (10) ont trouvé une relation entre la densité des cellules (définie sur gradient de densité) et la capacité métastasiante expérimentale. Ils ont trouvé que la lignée B16 F1 isolée par FIDLER (12), une lignée peu métastasiante, est plus dense que la lignée très métastasiante

B16F10. Ils ont ensuite divisé la lignée parentale B16 en deux sous-populations ayant des densités différentes et la sous-population la plus dense était encore la moins métastasiante. GRDINA et al., (5) ont séparé sur gradient de densité les cellules d'un fibrosarcome induit chez les souris par le méthylcholanthrène. Les cellules du groupe le plus dense étaient les moins métastasiantes. Ils ont montré que ce phénomène était lié ni à la taille des cellules ni à leur position dans le cycle cellulaire. SUZUKI et al., (15) ont trouvé que la capacité colonisante était liée à la position des cellules dans le cycle cellulaire, les cellules en G_1 étant les moins colonisantes et les cellules en phase S étant les plus colonisantes.

POSTE et al., (16) ont sélectionné des lignées à partir de la B16F1 par passages successifs *in vitro* à travers la membrane chorioallantoïdienne de poulet, la veine fémorale de chien ou la vessie de souris. Les cellules sélectionnées par la veine et la vessie avaient des capacités métastatiques spontanées plus élevées que la B16F1 non sélectionnée. Ces études montrent l'importance de la capacité envahissante dans le processus métastatique.

HART (17) a comparé la B16F10 et la B16-BL6, cette dernière étant une lignée sélectionnée à partir de la B16F10 par six passages d'envahissement de la vessie de souris *in vitro* (16). La B16-BL6 a une capacité métastasiante élevée après injection s.c. mais diminuée après injection i.v.. Il a trouvé que les propriétés de croissance *in vivo* et *in vitro*, d'adhésion à des cellules endothéliales ou au plastique, et la radioiodination des protéines de la surface cellulaire étaient similaires pour les deux lignées. La B16F10 produisait davantage d'activateur de plasminogène et était plus sensible au détachement par la trypsine *in vitro*. Ces résultats ne semblent pas indiquer qu'une diminution d'adhérence des cellules *in vitro* ou une augmentation de la production d'activateur de plasminogène puissent être liées à une capacité métastasiante plus élevée.

FIDLER (18) a montré que l'injection i.v. simultanée de lymphocytes (immuns ou non, à faible rapport lymphocytes : cellules tumorales) augmente le nombre de colonies pulmonaires formées. Il semblerait que ce phénomène serait dû à l'agglutination de lymphocytes et des cellules tumorales (19). Les embols de cellules ainsi formés se logeraient plus facilement dans les capillaires ce qui pourrait se traduire par une augmentation du nombre de métastases. Il a montré de plus que les lignées résistantes à la cytotoxicité lymphocytaire donnaient moins de colonies pulmonaires après injection i.v. (20).

L'adhésion des cellules tumorales à d'autres cellules ou constituants du sang a été souvent impliquée dans la fixation des cellules aux sites métastatiques.

La spécificité des cellules pour certains sites a été démontrée. NICOLSON et WINKELHAKE (21) ont trouvé que les lignées B16F1 à B16F10, qui ont une capacité croissante de donner des métastases pulmonaires (F10 > F6 > F1), formaient des aggrégats *in vitro* de façon spécifique avec des cellules pulmonaires et que ce phénomène était quantitativement lié à leurs capacités métastatiques expérimentales (F10 > F6 > F1).

NICOLSON et al., (22) ont montré que l'on peut sélectionner des lignées qui métastasent à divers sites spécifiques. Ils ont isolé des variants du mélanome B16 qui métastasent aux poumons, aux ovaires ou au cerveau. BRUNSON et al., (23) ont montré que les variants B16B1 à B16B10, qui métastasaient de façon croissante au cerveau, avaient des niveaux élevés de deux protéines (90 K et 100 K révélées par radioiodination de la surface cellulaire). Le niveau de radioiodination de ces protéines était en relation avec la quantité de métastases provoquées par injection i.v.

On a montré d'autre part que l'aggrégation des cellules tumorales avec des plaquettes peut aussi contribuer à la fixation des cellules aux sites métastatiques (24). En effet des plaquettes ont souvent été trouvées avec des cellules tumorales dans les embols fixés à l'endothélium des veinules et capillaires (24). L'injection intraveineuse de cellules tumorales a conduit à une diminution presque simultanée du nombre de plaquettes libres dans la circulation (25). Des cellules transformées ont induit l'aggrégation de plaquettes alors que les cellules normales correspondantes n'ont pas eu un tel effet (26). Une réduction progressive du nombre de plaquettes et une augmentation du fibrinogène et des produits de dégradation du fibrinogène ont été observés pendant la progression du carcinome pulmonaire de Lewis (27). Le fibrinogène s'accumulait dans la tumeur et aux poumons. Après injection i.v. de cellules tumorales une diminution rapide des plaquettes et du fibrinogène étaient observées (27). Les plaquettes peuvent aussi être une source de facteurs promoteurs de la croissance des cellules tumorales (28).

MAAT et HILGAARD (29) ont mis en question l'utilisation des anticoagulants dans le traitement des néoplasmes. En étudiant la littérature ils ont constaté que l'association de la fibrine avec des cellules métastatiques est surtout observée dans le cas des métastases expérimentales. Ils ont essayé trois anticoagulants l'Ancrod, l'Heparine et le Phenprocoumon. Tous diminuaient le taux de métastases expérimentales mais seul le Phenprocoumon diminuait le taux de métastases spontanées et cela probablement par un mécanisme non lié à son action anticoagulante. Le phenprocoumon inhibait aussi la croissance de la tumeur. Ce travail met en question la relation entre les métastases expérimentales et spontanées décrites par FIDLER (19) et KRIPKE et al., (14).

FITZPATRICK et STRONGFELLOW (30) ont trouvé que la production de prostaglandine D_2 (un inhibiteur de l'aggrégation des plaquettes) par les lignées B16F1 et B16F10 était lié de façon inverse à leurs pouvoirs métastatiques.

L'adhésion de cellules transformées à différents substrats *in vitro* peut être diminuée par rapport à l'adhésion de cellules normales (31).

Murray et al., (31) ont trouvé que l'adhésion de fibroblastes, normaux, transformés ou métastatiques, à différents types de collagène (I et IV) et au plastique était différente. Les deux lignées néoplasiques avaient un pouvoir d'adhésion diminué. La lignée transformée adhérait aux collagènes type I et IV mais pas au plastique. La lignée métastatique n'adhérait qu'au collagène type IV (le type IV est le collagène des membranes basales). L'adhésion des cellules pouvait être augmentée par l'addition de la fibronectine. La lignée métastatique adhérait mieux au collagène type I en présence de fibronectine mais son adhésion au type IV restait inchangée.

McINTYRE et al., (32) ont aussi trouvé des différences d'adhésion parmi des cellules tumorales d'origine pancréatique. Une des trois lignées qu'ils ont étudié dépendait de la fibronectine, pour son adhésion aux quatre types de collagènes.

Depuis dix ans beaucoup d'équipes se sont intéressés à la fibronectine. La fibronectine est une glycoprotéine qui est trouvée dans la matrice extracellulaire *in vitro* et *in vivo*. Elle se trouve aussi dans le plasma sous une forme peut être légèrement différente mais immunologiquement identique. Plusieurs revues traitent de ses fonctions physiologiques et biochimiques (36, 37, 38).

La fibronectine a attiré l'attention de groupes travaillant sur la transformation néoplasique après que l'on ait observé que la quantité de cette protéine est diminuée chez les cellules transformées *in vitro* (36).

La fibronectine forme une matrice extracellulaire autour de certaines cellules normales *in vitro* (40). On la trouve *in vivo* dans les membranes basales des capillaires, des veines, des artères, de la muqueuse intestinale,

.../...

aussi favoriser l'attachement des cellules à des couches de fibrine ou de fibrinogène *in vitro* (48).

Il existe donc des indications qu'une diminution de la fibronectine soit liée à une augmentation de la tumorigénicité. Par ailleurs, ses interactions avec le fibrinogène, les plaquettes et les macrophages et son importance lors de l'adhésion des cellules à divers substrats, (le collagène en particulier) suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans le processus métastatique.

Objectifs de cette thèse

Nous nous sommes intéressés au processus métastatique et en particulier à l'influence de certains caractères d'adhésion pouvant modifier ce processus. Ces caractères d'adhésion sont : l'expression *in vitro* de la fibronectine et la sensibilité au détachement par la trypsine.

Ainsi qu'il a été décrit dans la littérature il est possible que la fibronectine joue un rôle important dans la dissémination métastatique parce qu'elle intervient dans le processus d'adhésion des cellules. Des cellules, ayant une capacité limitée de former une matrice extracellulaire de fibronectine, seraient moins fermement attachées à leurs voisines. Elles s'échapperaient plus facilement de la tumeur pour former un nombre élevé de métastases spontanées. Mais, ayant une capacité d'adhésion diminuée elles s'attacheraient moins aisément aux sites métastatiques et donc injectées directement dans la circulation (voie i.v.), elles auraient une tendance moindre à développer des colonies pulmonaires. Dans le cas de cellules capables de développer une matrice de fibronectine importante, on devrait trouver la situation inverse :

- une tendance accrue à rester dans la tumeur, d'où peu de métastases spontanées
- et une tendance accrue à s'attacher aux sites métastatiques, d'où une haute capacité à former des colonies pulmonaires.

Afin de démontrer cette hypothèse, c'est-à-dire le rôle majeur de la capacité d'adhésion des cellules tumorales dans la dissémination métastatique, il était nécessaire de disposer de plusieurs lignées de cellules clonées, dérivée d'une même tumeur. Ces lignées tumorales clonées devaient être différentes entre elles pour leur comportement *in vivo*, tumorigénicité et invasivité. Il resterait à démontrer d'une part que la capacité à donner des métastases spontanées est inversement liée à celle de former des colonies

/...

pulmonaires par injection i.v.. D'autre part que ce phénomène est lié à la capacité plus ou moins grande des cellules de produire une matrice extracellulaire, et d'être capable de se détacher plus ou moint vite d'un support solide sous l'influence de la trypsine.

L'étude de plusieurs lignées de cellules clonées dérivées d'une même tumeur permet premièrement, d'observer l'hétérogénéité des populations cellulaires de la tumeur et deuxièmement de rechercher des corrélations entre les capacités tumorigènes et métastatiques différentes de ces lignées et divers caractères biologiques.

Un rhabdomysarcome induit par injection i.m. de 20 mg de nickel pur (54) est utilisé dans ce travail. On sait que l'injection i.m. de nickel ou de sous sulfure de nickel est un moyen efficace pour induire des rhabdomyosarcomes chez le rat (52, 53). Ces tumeurs métastasent spontanément aux poumons et aux ganglions lymphatiques (54).

Pour caractériser ce modèle *in vivo*, nous devons répondre à la question suivante :

. est-ce qu'une série de lignées clonées à partir de cette tumeur montrerait des comportements hétérogènes pour les caractères concernant :

- . la tumorigénicité
- . la croissance *in vivo* après injection s.c. de cellules
- . le pouvoir métastatique spontané après injection s.c. de cellules
- . le pouvoir métastatique expérimental après injection i.v. de cellules.

Les caractères suivants ont été étudiés *in vitro* :

- . l'expression d'une matrice extracellulaire de fibronectine
- . la sensibilité au détachement par la trypsine

. le caryotype

. la croissance

. la différenciation en myotubules

La question posée est de savoir si l'on retrouve pour ces caractères un comportement hétérogène d'une lignée à l'autre, et s'il y a une corrélation entre ces caractères étudiés *in vitro* et le comportement *in vivo* des diverses lignées cellulaires.

L'expression de la fibronectine est étudiée afin de déterminer son rôle dans la dissémination métastatique.

La facilité du détachement des cellules sous l'action de la trypsine, peut donner des indications concernant l'intensité de l'adhésion des cellules sur la matière plastique.

Dans le but de mettre en évidence une relation entre malignité et nombre de chromosomes, nous avons étudié le caryotype des cellules des différentes lignées.

La croissance *in vitro* et la différenciation en myotubyles sont analysées pour voir si ces caractères reflètent un comportement particulier *in vivo*.

MATERIEL ET METHODES

PROVENANCE DES PRODUITS.-

- Milieu de Eagle Modifié par Dulbecco - GIBCO
- Sérum Embryonnaire de Veau - GIBCO
- Streptomycine-Pénicilline - GIBCO
- Trypsine - GIBCO
- AH-Sépharose - PHARMACIA
- Gélatine type I - SIGMA
- Anticorps fluorescents anti-IgG de lapin - Institut PASTEUR Production
- Colorants, tampons, sels et autres réactifs - PROLABO ou MERCK

ENTRETIEN DES CELLULES.-

Conditions de culture

Le milieu de culture utilisé pour toutes les expériences *in vitro* était le Dulbecco's Modified Eagle's Medium additionné de 10 % de sérum de veau foetal (inactivé à 56°C) et de 1 % d'une solution antibiotique, streptomycine-penicilline 5 x 10^3 U/ml) Les cellules étaient cultivées dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide avec 10 % de CO_2.

Réserve de cellules en azote liquide

Les cellules dans le milieu complet et 10 % de glycérine, sont congelées et stockées en azote liquide. Ces réserves ont permis de procéder aux expériences entre les passages 19 et 25, afin de réduire les risques d'évolution du phénotype des cellules entrainés par de nombreux passages.

.../...

Mycoplasmes

Toutes les lignées ont été examinées pour vérifier l'absence de mycoplasmes par coloration en Hoechst 33 258 et observations au microscope UV (59). Aucune infection par des mycoplasmes n'a été trouvée.

Animaux

Des rats mâles WAG, (Animalerie IRSC-Villejuif) âgés de 8 à 10 semaines ont été utilisés pour toutes les expériences *in vivo*.

ORIGINE DES CELLULES TUMORALES.-

La tumeur primaire

La tumeur primaire était induite dans ce laboratoire par une injection intramusculaire de 20 mg de Nickel (54).

Cette tumeur est appelée 9-4. A l'autopsie, cette tumeur avait un diamètre de 20 mm et des métastases étaient présentes aux niveaux des poumons et des ganglions lymphatiques. Elle a été identifiée à l'histologie comme étant un rhabdomyosarcome.

La lignée cellulaire parentale 9-4/0

Après prélèvement stérile la tumeur 9-4 a été coupée en deux et une moitié a été utilisée pour la mise en culture. Le tissu, finement coupé en PBS a été dissocié par agitation à 37°C pendant 30 minutes dans une solution de trypsine à 0,25 %. Du milieu complet a été ajouté pour arrêter l'action de la trypsine et la suspension a été centrifugée (10 minutes à 1000 rpm*). Les cellules ont été suspendues en milieu complet et ensemencées dans des boîtes de Pétri. Cette lignée parentale est appelée 9-4/0.

* - rpm = Rotations par minute.

.../...

Les lignées cellulaires clonées, F 9-4/6 à F 9-4/25

La lignée 9-4/0 a été clonée au 13ème passage *in vitro*. Une suspension de cellules à la concentration théorique de 1 cellule/ml a été distribuée dans les puits d'une plaque de Microtest à raison de 0,25 ml/puit. Les puits étaient inspectés régulièrement au microscope et ceux où deux ou plusieurs clones apparaissaient, étaient éliminés. Chaque colonie a été repiquée dans une boîte de 60 mm pour un passage. Les cellules ont été cultivées puis clonées une seconde fois identiquement afin d'assurer leur origine monocellulaire. Chaque lignée est issue d'une colonie différente du premier clonage. Ainsi seize lignées ont été isolées dont treize figurent dans cette étude. Ces lignées sont appelées F 9-4/6, F 9-4/8, F 9-4/9 et ainsi de suite.

CARACTERISATION *IN VIVO*.-

Les expériences *in vivo* ont été conduites en utilisant des cellules cultivées. Ces cellules ont été injectées soit par voie sous-cutanée soit par voie intraveineuse. Les cellules en cultures subconfluentes ont été trypsinisées (1 ml de trypsine 0,25 % par boîte de 10 ml pendant 3-5 minutes) resuspendues en milieu complet, centrifugées (10 minutes 1000 rpm) et resuspendues en PBS. La suspension cellulaire était ajustée et calculée pour injecter le nombre de cellules désiré dans un volume de 0,1 ml de PBS.

Injections sous-cutanées.

Les cellules étaient injectées par voie sous-cutanée sur le flanc gauche à un tiers de la distance du membre postérieur au membre antérieur. Pour chaque lignée cellulaire quatre doses de cellules étaient injectées

.../...

soit 10^3, 10^4, 10^5 ou 10^6 cellules par animal, à des groupes de cinq rats par dose. Les animaux étaient palpés une fois par semaine, le délai d'apparition des tumeurs était noté, la taille des tumeurs était mesurée avec un pied à coulisse (mesure de 2 diamètres perpendiculaires) jusqu'à la mort. Des métastases axillaires et inguinales étaient détectées par palpation à l'examen hebdomadaire, leur délai d'apparition et leur croissance étaient notés. Les animaux moribonds étaient autopsiés. A l'autopsie, la tumeur et les métastases aux ganglions lymphatiques, inguinaux, axillaires et lombo-aortiques étaient mesurées. Les nodules métastatiques visibles à la surface des poumons étaient comptés. La présence de métastases médiastinales extrapulmonaires étaient notées et leurs quantités estimées de 0 à ++++. Des morceaux des divers tissus atteints étaient prélevés et fixés dans le fixateur de Bouin pour examen histologique.

Injections intraveineuses

Des groupes de 10 rats ont reçu identiquement 10^5 cellules par injection i.v. dans la veine de la queue. Au préalable les animaux étaient légèrement anesthésiés (0,2 ml de 6 % Nembutal i.p.) et gardés à 37°C pendant 10 minutes. Les tubes contenant les suspensions à injecter ont été gardés sur glace pilée. Cette mesure a pour objectif d'empêcher l'aggrégation des cellules avant l'injection. Les animaux ont été sacrifiés dix semaines plus tard et le nombre de colonies tumorales visibles à la surface des poumons a été compté. Une autopsie complète était pratiquée sur ces animaux et la présence de métastases était notée. Des prélèvements ont été faits pour examen histologique. Le choix de dix semaines comme temps de sacrifice a été fait sur la base des résultats des expériences préliminaires. A dix semaines les colonies pulmonaires étaient, en général, assez grandes pour être visibles

mais pas trop grandes pour ne pas être distinctes les unes des autres. Pour les animaux ou plus de vingt cinq colonies étaient trouvées, un certain degré de confluence des colonies avoisinantes était cependant noté.

CARACTERISATION *IN VITRO*.-

Courbes de croissances

Les cellules étaient ensemensées dans des boîtes de 60 mm à 50 000 cellules par boîte. Toutes les vingt quatre heures deux boîtes étaient trypsinisées et les cellules étaient comptées sur un Compteur Coulter.

Efficacité de clonage

Les cellules étaient ensemencées à 50 cellules par boîte dans 10 boîtes de 60 mm. Dix ou quinze jours après les cellules étaient fixées au méthanol pour 5 minutes et colorées au Giemsa à 10 % pour 30 minutes.

Morphologie

Pour l'étude de la morphologie des cellules étaient ensemencées sur des lamelles de verre en boîtes de 60 mm. Les lamelles ont été fixées (méthanol 5 minutes) quand les cultures étaient clairsemées, subconfluentes ou confluentes. Les cellules ont été colorées soit au May Grunwald-Giemsa soit au bleu de Toluidine.

Caryotypes

Le nombre moyen de chromosomes de chaque lignée a été déterminé.

Quarante huit heures après l'ensemencement de 1,5 x 10^6 cellules/boîte, la colchicine à une concentration finale de 5 µg/ml a été ajoutée.

.../...

Les cellules étaient récoltées trois heures après par trypsinisation, centrifugées et resuspendues dans 2 ml d'une solution hypotonique (eau distillée/milieu sans sérum, 2:1, v/v). La durée du choc hypotonique était de cinq à dix minutes. Le choc a été arrêté et les cellules ont été fixées, par l'addition de 2 ml de fixateur (méthanol/acide acétique 3:1, v/v), en laissant le tube 2 minutes dans de la glace pilée. Après une centrifugation (5 minutes, 1000 rpm) le surnageant a été éliminé et 2 ml de fixateur ajouté aux cellules, le tube était laissé encore 2 minutes sur la glace pilée. Les cellules étaient ensuite étalées sur des lames de verre (baignées dans de l'eau froide), séchées et colorées au May Grunwald-Giemsa. Le nombre de chromosomes était déterminé pour 50 mitoses par lignée.

Sensibilité au détachement par la trypsine

Des courbes montrant la sensibilité au détachement par la trypsine ont été établies de la façon suivante : une série de 20 boîtes de Pétri (diamètre 60 mm) a été préparée à raison de 10^5 cellules par boîte. Après une incubation de 24 heures à l'étuve (37°C, 10 % CO_2), les boîtes ont été rincées 2 fois avec du PBS. La trypsine (0,025 %, 5 ml/boîte) est ajoutée et maintenue 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 et 60 minutes, 2 boîtes identiques pour chaque point. Les cellules détachées sont récoltées après une agitation douce (en penchant la boîte et en imprimant 5 fois un mouvement de rotation). 5 ml d'Isoton sont ajoutés à la suspension. Le nombre de cellules détachées dans le surnageant était déterminé sur un Compteur Coulter. Les expériences étaient conduites à la température du laboratoire. La température de la solution de trypsine, contrôlée au début de chaque expérience était de 21 à 22°C. Les résultats pour chaque temps sont exprimés en pourcentage du nombre total de cellules dans une boîte. L'expérience a été répétée entre deux et trois fois pour chaque lignée.

.../...

Etude de la fibronectine *in vitro* par immunofluorescence

Les cellules ont été ensemencées à 50 000 cellules par boîte sur des lamelles de verre. Ces cultures ont été fixées à différentes étapes de leur croissance : cellules clairsemées, subconfluentes ou confluentes. Les techniques de fixation et de marquage sont :

- laver les cellules sur lamelle 2 fois avec du PBS
- Fixer 20 minutes avec un mélange de formaldéhyde/PBS (3 %)
- Laver 4 fois avec du PBS
- Marquer 20 minutes avec un anti-sérum de lapin anti-fibronectine au 1/50 ou 1/100 ou un sérum de lapin normal au 1/50 ou 1/100
- Laver 4 fois avec du PBS
- Marquer 20 minutes avec un anti-sérum de chèvre, anti IgG de lapin conjugué à la fluorescéine dilué au 1/20
- Laver 4 fois avec du PBS
- Monter les lamelles avec 1 goutte de glycérine tamponnée à (50 % de glycérine dans du PBS)
- Regarder au microscope UV. L'aspect de la fibronectine a été noté et la quantité estimée de + à ++++

(voir photos représentatives Planche 4).

Les anti-sérums anti-fibronectine ont été fournis par M. BURTIN, I.R.S.C pour l'anti-sérum anti-fibronectine humaine (Behring) et M. MONSIGNY, C.N.R.S. d'Orléans pour l'anti-sérum anti-fibronectine de bovin.

Des anti-sérums anti-fibronectine de rat ont été préparés pour cette étude et pour faire des essais quantitatifs.

Les photos ont été prises avec un microscope Leitz Orthoplan et sur film Kodak Tri X Pan (400 ASA) ou Kodak Ektachrome (400 ASA).

Préparation des anti-sérums antifibronectine de rat.

La fibronectine de rat a été purifiée selon la méthode de ENGVALL et RUOSLATHI (60). Cette préparation a été utilisée pour immuniser des lapins.

Les anti-sérums ont servi ensuite à l'étude par immunofluorescence de la fibronectine des cellules *in vitro*.

La purification de la fibronectine de rat a pu être réalisée en raison de sa grande affinité pour la gélatine. Une colonne de 10 ml de gélatine AH-Sépharose a été préparée. La fibronectine a été purifiée ensuite selon le schéma suivant :

- Préparer 30 ml de plasma citraté de rat (1 ml de citrate à 3,8 % pour 4 ml de sang)
- Ajouter quelques gouttes de DFP (diisopropyl fluorophosphate)
- Pré-équilibrer la colonne avec 50-60 ml de tampon phosphate pH 7,2 + 0,1 M Na_3 Citrate
- Passer deux fois le plasma sur la colonne
- Rincer la colonne avec 500-600 ml de tampon phosphate + 0,01 M Na_3 Citrate
- Rincer la colonne avec 100 ml de tampon tris pH 7,5 + 1M urée
- Eluer la protéine fixée avec un tampon tris pH 8,5 + 6M urée par aliquots de 3 ml
- Suivre l'élution à 280 nm ($A_{280}^{1mg} = 1,28$)
- Dialyser contre 5 litres d'eau distillée
- Concentrer à ≃ 1mg/ml.

.../...

Immunisation.

Trois lapins ont été immunisé selon le régime suivant :

- Jour 1 1,2 mg protéine en 2 ml PBS + 2 ml d'adjuvant de Freund
- Jour 14 1,2 mg protéine en 2 ml PBS + 2 ml d'adjuvant de Freund
- Jour 31 1,4 mg protéine en 2 ml PBS + 2 ml d'adjuvant de Freund
- Jour 76 0,6 mg protéine en 2 ml PBS + 2 ml d'adjuvant de Freund

Les lapins ont été saignés aux jours suivants après la première injection : 33 jours et 84 jours.

Les antisérums ont été testés sur des cellules en culture. L'efficacité des antisérums a été mise en évidence par l'immunufluorescence.

Efficacité des antisérums de la saignée faite à 33 jours :

N° du lapin	la dilution des antisérums		
	1/10	1/50	1/100
1111	bon	bon	plus faible
1187	bon	bon	plus faible
1189	bon	bon	bon

Dilués au 1/10 les antisérums marquaient les cellules sous forme de points brillants, comme les sérums de lapins non-immunisés. Les points étaient absents aux dilutions de 1/50 ou supérieures.

Efficacité des antisérums de la saignée faite à 84 jours :

N° de lapin	la dilution des antisérums		
	1/50	1/100	1/500
1111	faible	faible	absent
1187	bon	bon	faible
1189	bon	bon	un peu plus faible

.../...

Ces antisérums antifibronectine de rat ont marqué les cellules de la même façon que les antisérums antifibronectine bovine ou humaine fournis. Les images ressemblent à celles publiées par CHEN (57) qui a étudié la fibronectine de la lignée myoblastique L6.

RESULTATS

CARACTERISATION *IN VIVO*.-

TUMORIGENICITE ET CROISSANCE APRES INJECTION SOUS-CUTANEE DE CELLULES.

Nous avons défini 3 paramètres de croissance *in vivo* des tumeurs, après injection s.c. de cellules.

1 - DT50 : la DT50 est le nombre calculé de cellules nécessaire pour induire 50 % de tumeurs chez les animaux injectés.

2 - La première phase de croissance : est le délai, exprimé en jour, qui sépare le jour de l'injection des cellules du jours où la tumeur atteint un diamètre de 15 mm.

3 - La deuxième phase de croissance : est le nombre de jours nécessaire à la croissance d'une tumeur d'un diamètre de 15 mm jusqu'à un diamètre de 30 mm.

.../...

La lignée parentale

Les cellules de la lignée parentale ont induit des tumeurs à toutes les doses injectées. Le nombre d'animaux positifs par groupe a augmenté avec le nombre de cellules injectées. A la dose de 10^3 cellules, 3 rats sur 5 ont présenté une tumeur, à la dose de 10^4 cellules 4 animaux sur 5 animaux porteurs de tumeur. Aux doses de 10^5 et 10^6 cellules cent pour cent des animaux étaient porteurs de tumeur. A partir de ces résultats on peut calculer la DT50 comme étant de 3 100 cellules (Tableau 1). La figure 1A montre les courbes de croissance de ces tumeurs. Chaque courbe représente le diamètre moyen des tumeurs induites par dose de cellules injectées en fonction du temps. Les animaux négatifs n'ont pas été utilisés dans le calcul de ces moyennes. Les deux phases de croissance sont déterminées à partir des courbes de croissance (Figure 1B). La première phase de croissance dépend du nombre de cellules injectées : elle est plus longue pour les petites doses. Alors qu'elle était de 49 jours pour 10^3 cellules injectées et de 32 jours pour 10^6 cellules injectées. La deuxième phase, en général plus courte que la première, ne dépend pas du nombre de cellules injectées. Elle était de 30 jours pour 10^3 cellules injectées et de 25 jours pour 10^6 cellules injectées. Cette différence n'est pas significative. Pour faciliter l'analyse des phases de croissance, des droites ont été établies à partir des valeurs obtenues pour chaque dose de cellules. Une valeur représentant la durée de chaque phase a été calculée pour la dose arbitraire de 5.10^4 cellules injectées. Ces valeurs sont de 38 jours pour la première phase et de 34 jours pour la deuxième phase (Tableau 2).

Il faut noter qu'une tumeur sphérique ayant un diamètre de 15 mm a un volume de 1 767 mm^3 et une tumeur sphérique de 30mm a un volume de 14 137mm^3. Donc une tumeur de 30 mm représente une croissance en volume de huit fois la tumeur de 15 mm. Les diamètres ont été utilisés parce qu'ils montrent de façon très claire les deux phases.

Les lignées clonées

Les DT50 des treize lignées clonées sont données dans le Tableau 1. On ne peut dans tous les cas fournir un chiffre exact de la DT50 ceci étant dû à la tumorigénicité élevée de certaines lignées par rapport aux doses de cellules injectées ou à l'absence de réponses intermédiaires. Néanmoins on peut diviser les DT50 selon 3 degrés de tumorigénicité :

- forte < 1000 cellules, 7 lignées, les plus tumorigènes,
- intermédiaires > 1000 et < 10 000 cellules, 5 lignées, rappelant ce que l'on observe de la lignée parentale.
- faible > 10 000 cellules, une lignée, la moins tumorigène.

Les durées des deux phases de croissance sont données dans le Tableau 2 pour la dose arbitraire de 5.10^4 cellules injectées. On peut voir que la première phase était très hétérogène variant de 32 à 93 jours. Par contre la deuxième phase était peu variable se situant entre 20 et 32 jours.

On peut d'autre part constater que la lignée F9-4/18, la seule à posséder une DT50 > 10 000 cellules, avait aussi la première phase la plus longue soit 93 jours. On retrouve cet effet bien que d'une façon moins nette pour les autres clones. La durée moyenne de la première phase des clones à DT50 intermédiaire était 53,4 jours contre 41,7 jours pour les clones à forte tumorigénicité.

Si on tient compte des résultats obtenus par J. POT-DEPRUN et M.F. POUPON avec huit autres lignées isolées de la culture 9-4/0 (voir article ci-joint Heterogeneity of the growth and metastatic behaviour of cloned cell lines derived from a primary rhabdomyosarcoma, Tableau 1) on trouve que la durée moyenne de la première phase est statistiquement différente ($p < 0,05$ Student's t test) entre les groupes de tumorigénicité faible et forte.

LA CAPACITE METASTATIQUE SPONTANEE APRES INJECTION S.C. DES CELLULES.

Les animaux portant les tumeurs dont la croissance avait été suivie, ont été autopsiés quand leur état général laissait présager une mort imminente. Comme il y avait peu d'animaux par groupe, à la fois pour les lignées et la dose injectée et comme aucune différence n'a été constatée entre les animaux ayant reçu des doses différentes de cellules, les autopsies ont été regroupées par lignée cellulaire.

La lignée parentale

Les métastases sont apparues essentiellement au niveau des ganglions lymphatiques, inguinaux, axillaires, abdominaux et médiastinaux ainsi qu'aux poumons. Des résultats identiques ont été obtenus avec la tumeur primaire induite par le nickel.

Les métastases inguinales et axillaires, détectées pendant les examens hebdomadaires sont apparues chez 13 animaux sur 17 alors que les tumeurs avaient atteint un diamètre d'environ 30 mm et ceci quel que soit le nombre de cellules injectées. Les ganglions axillaires étaient envahis plus tardivement et les ganglions contralatéraux à la tumeur étaient rarement envahis.

A l'autopsie (Tableau 3) les tumeurs avaient un diamètre moyen de 38 mm (écart ; 25-50 mm). Des nodules tumoraux étaient observés à la surface des lobes des poumons de 12 animaux sur 15. Le degré d'invasion des poumons était variable. Le nombre de métastases visibles à la surface était de 1 à 25 ($m = 9 \pm 2,1$). Ces métastases mesuraient de < 1 mm à 8 mm. Quand les nodules dépassaient environ 4 mm et surtout lorsque leur nombre augmentait, ils avaient tendance à confluer. Le tissu médiastinal était envahi chez 12 animaux sur 15 mais l'intensité de l'invasion par du tissu tumoral était indépendante du nombre de nodules tumoraux pulmonaires. Six des quinze rats autopsiés portaient des métastases aux ganglions lomboaortiques.

.../...

Les lignées clonées

Les résultats des autopsies (Tableau 3) donnent la taille moyenne des tumeurs, le pourcentage d'animaux avec chaque type de métastase et le nombre moyen de nodules pulmonaires chez ces animaux. Toutes les tumeurs induites par injection de cellules tumorales clonées envahissaient les mêmes sites que la tumeur induite par injection de cellules tumorales parentales ou que la tumeur primaire. Les métastases aux ganglions lymphatiques, inguinaux et axillaires détectées par palpation apparaissaient quand les tumeurs avaient atteint un diamètre de 30-40 mm. Cette observation était identique pour tous les clones et pour la lignée parentale.

A l'autopsie le pourcentage d'animaux portant des métastases inguinales étaient 88-100 % pour tous les clones. La proportion d'animaux avec des métastases axillaires était variable, entre 38 et 100 % par groupe.

Les ganglions lymphatiques contralatéraux à la tumeur étaient moins fréquemment envahis. De 6 à 53 % des rats portaient des métastases inguinales contralatérales et de 0 à 21 % portaient des métastases axillaires contralatérales. Les ganglions lomboaortiques étaient envahis de 17 à 100 % des cas selon les clones.

La taille des métastases inguinales axillaires et lomboaortiques n'a pas révélé de différences entre les clones. Les diamètres moyens de ces métastases étaient : inguinales 20 mm, axillaires 17 mm (ipsolatérales), lomboaortiques 17 mm, inguinales 9 mm et axillaires 9 mm (contralatérales).

Toutes les lignées ont provoqué des métastases pulmonaires dans 80-100 % des cas. Le nombre moyen de métastases visibles à la surface des poumons variait d'un clone à l'autre. Le clone F 9-4/8 peu métastasiant a donné $10 \pm 2,6$ nodules par animal. Les clones F 9-4/6 et F 9-4/9, très métastasiant ont donné $35 \pm 4,3$ et $28 \pm 6,9$ nodules par animal. En général les lignées

.../...

clonées ont montré une capacité métastatique aux poumons qui était égale ou plus grande que celle de la lignée parentale.

Des métastases extrapulmonaires médiastinales ont été trouvées chez 14 à 88 % des animaux par groupe. Le nombre de ces métastases quantifiées de + à ++++ par animal variait peu en moyenne parmi les clones.

L'analyse des résultats des autopsies montre qu'il existe une relation directe entre le degré d'envahissement observé à un site donné et celui observé aux autres. Cette observation est particulièrement évidente dans le cas de la relation entre le pourcentage de rats par groupe avec des métastases lomboaortiques et le nombre moyen de métastases pulmonaires (Figure 4). Il apparaîtrait donc que l'envahissement métastatique des poumons (probablement par voie hématogène dans la plupart des cas) et l'envahissement des ganglions lymphatiques (probablement par voie lymphatique) exigent des propriétés similaires de la part de ces cellules tumorales.

Le pourcentage d'animaux portant des métastases médiastinales extrapulmonaires fait exception, ne montrant pas de relation avec les autres types de métastases. La relation est plutôt inverse entre le pourcentage des rats avec métastases lomboaortiques et le pourcentage des rats avec métastases médiastinales.

La taille moyenne des tumeurs à l'autopsie semble être liée à la capacité métastatique. La figure 5 montre la relation entre les métastases pulmonaires et lomboaortiques. La taille moyenne des tumeurs de chaque groupe est donnée à côté du point correspondant. Si on étudie pour chaque clone, la relation animal par animal, entre le diamètre de la tumeur et l'invasion métastatique on ne voit aucune liaison. Il semblerait que cette relation soit caractéristique de l'image totale de chaque clone et non un artéfact produit par l'autopsie trop précoce de certains animaux. En gros, les tumeurs de

de certains clones seraient plus localement développées (diamètre moyen plus grand) et plus métastasiante.

LES METASTASES EXPERIMENTALES PROVOQUEES PAR INJECTION INTRAVEINEUSE DE CELLULES.

La lignée parentale.

L'injection i.v. de 10^5 cellules a provoqué la formation de $7 \pm 3,2$ colonies pulmonaires.

Les lignées clonées.

L'injection intraveineuse de cellules clonées a provoqué des colonies pulmonaires mais aussi parfois, un envahissement du tissu médiastinal extra-pulmonaire et d'autres sites (Tableau 4). Tous les clones ont provoqué des colonies pulmonaires. On peut répartir les clones en deux groupes en fonction du nombre moyen de colonies pulmonaires observé :

- un groupe, peu colonisant comme la lignée parentale, représenté par 8 clones qui ont provoqué en moyenne entre 1 et 7 colonies,
- un deuxième groupe, très colonisant comportant 5 clones qui ont provoqué en moyenne entre 17 et 22 colonies.

Le nombre de colonies induites par chaque lignée du groupe "très colonisant" diffère significativement du nombre moyen de colonies pulmonaires obtenues par injection i.v. des cellules parentales ($p < 0,05$ ou $0,02$ sauf F 9-4/23 $p < 0,10$ Student's test Tableau 4). Les moyennes des lignées du groupe peu colonisant ne sont pas différentes de la moyenne de la lignée parentale.

La capacité de donner un envahissement extrapulmonaire était directement liée à la capacité de donner des colonies pulmonaires (Tableau 4). Ce phénomène est observé dans le groupe peu colonisant : envahissement médiastinal extrapulmonaire rare ou absent et dans le groupe très colonisant

.../...

où l'on note une haute fréquence d'envahissement du tissu médiastinal. Par exemple, le clone F 9-4/20, très colonisant (20 $\pm$ 3,9 colonies pulmonaires) a envahi le médiastin de 8 rats sur 10, les ganglions abdominaux de 2 rats sur 10 a donné une métastase au niveau de la cuisse et à deux reprises une tumeur dorsale.

HISTOLOGIE.

Tumeur originale

L'aspect histologique de la tumeur ayant servi de source pour l'isolement des clones en culture, est celui caractéristique des rhabdomyosarcomes induits par le nickel (94).

On distingue des zones constituées de cellules fusiformes de taille variable mono ou plurinuclées, rappelant des fibres musculaires et le plus souvent accompagnées d'un stroma conjonctif bien développé (Planche 1). On distingue également des zones constituées de cellules plus éosinophiles vaguement fusiformes, mononuclées ou en plasmodes (Planche 1) ou constituées de cellules relativement petites, plus basophiles et envahissant les tissus voisins (Planche 1).

Tumeurs sous cutanées après injection de cellules

L'étude histologique n'est pas très informative car les prélèvements ont été réalisés *in extremis*. Or à ce moment il y a des modifications structurales et morphologiques considérables entrainées par une nécrose ischémique.

Dans les zones de nécrose, les cellules tumorales montrent un aspect franchement fibroblastique. Dans les zones non nécrotiques on observe surtout des cellules mono et multinuclées comme les cellules de la tumeur primitive (Planche 1).

.../...

Les métastases reproduisent à peu près les aspects cellulaires des zones non nécrotiques des tumeurs sous-cutanées (Planche 2).

Colonies pulmonaires après injection i.v. des cellules

On observe des colonies constituées de :

- cellules plus ou moins fusiformes
- cellules mono ou plurinuclées et
- de petites cellules vaguement fusiformes.

Cependant dans certaines colonies, on peut trouver ensemble les divers types de morphologie cellulaire. On peut trouver les divers types de colonies dans le poumon du même animal.

Actuellement on ne peut pas faire état de différences précises entre les aspects histologiques des diverses lignées.

CARACTERISATION *IN VITRO*.-

LES COURBES DE CROISSANCE.

La lignée parentale 9-4/0.

In vitro, les cellules de la lignée parentale avaient un temps de doublement de 23 heures et une densité de saturation de 2,3 x 10^5 cellules/cm^2 (Tableau 5).

Les lignées clonées.

La croissance *in vitro* des lignées clonées était très hétérogène (Tableau 5). Six lignées avaient des temps de doublement plus courts (15-18 heures) que la lignée parentale, 5 lignées étaient semblables (22-22 heures) et 2 lignées avaient des temps de doublement plus longs (22-30 heures). Les densités de saturation peuvent aussi être réparties en trois groupes :

- plus bas que la parentale (0,9-1,8 x 10^5 cellules/cm^2) : 7 lignées,
- semblable à la parentale (2,4-2,9 x 10^5 cellules/cm^2) : 4 lignées,
- et, plus élevé que la parentale (3,3-3,8 x 10^5 cellules/cm^2) : 2 lignées.

Il n'y a pas de relation significative entre le temps de doublement et la densité de saturation.

LA MORPHOLOGIE.

Les cellules clonées utilisées dans cette étude sont issues d'un rhabdomyosarcome. Elles sont donc d'origine musculaire et ont gardé leur capacité de se différencier en myotubules. Ces myotubules, qui résultent de la fusion de plusieurs cellules myoblastiques, ont de multiples noyaux. Les différentes lignées ont été classées selon leurs capacités de former des myotubules. Cette classification de 0, + à ++++ est donnée dans le Tableau 6. La planche 3 montre des images représentatives des 4 groupes + à ++++. A l'exception des clones F 9-4/9 et F 9-4/14, les clones et la lignée parentale présentaient à un degré variable une différenciation en myotubules.

Cette différenciation allait de la simple présence de quelques myotubules, +, (6 clones) à la présence de grandes nappes de myotubules liés entre eux par des extensions cytoplasmiques, ++++ (3 clones).

Ces résultats sont valables pour les passages 18 à 24. La capacité de différenciation diminuait pour les passages avancés. Par exemple, le clone F 9-4/13 qui au 22ème passage était classé ++++ ne l'était que de + au 32ème passage. De la même façon la lignée parentale qui avait une capacité de différenciation de +++ au 4ème passage n'était classée que + au 21ème.

Une diminution de 10 à 1 % de la concentration de sérum dans le milieu de culture entrainait une augmentation de la différenciation.

CARYOTYPES.

Le nombre moyen de chromosomes par mitose a été déterminé pour chaque lignée. Ces résultats sont donnés dans le Tableau 7.

.../...

La lignée parentale a en moyenne 73 chromosomes par mitose. Pour 7 clones le nombre moyen de chromosomes par mitose était de 81 à 89 ; deux clones avaient une moyenne située à 94 et 97 alors que pour deux autres cette moyenne n'atteignait que 72 et 74. Le F 9-4/20 n'a que 55 chromosomes en moyenne et le F 9-4/13 est très différent des autres lignées n'ayant que 42 chromosomes en moyenne. Il faut noter que le nombre modal de chromosomes est souvent plus élevé que la moyenne. En effet celle-ci se trouve diminuée par la présence de mitoses ayant un nombre plus faible de chromosomes : voir histogrammes représentatifs en bas du tableau 7. Le F 9-4/20 ne montre pas clairement de nombre modal, la fréquence étant à peu près égale entre 12 et 95 chromosomes avec une légère hausse autour de 83. Il est certain que beaucoup de mitoses ayant moins de 35 chromosomes n'auraient pas produit de cellules viables. On rappelle que le caryotype normal du rat est :
2 n = 42 chromosomes.

LA SENSIBILITE AU DETACHEMENT PAR LA TRYPSINE.

Des courbes ont été établies montrant la cinétique de détachement des cellules par la trypsine. Deux courbes sont données à titre d'exemple en bas du Tableau 8. A partir de ces courbes on a déduit le temps nécessaire au détachement de 50 % des cellules. Ces temps sont donnés dans le Tableau 8 pour toutes les lignées.

Ces essais étaient reproductibles de façon satisfaisante. Il faut souligner que 24 heures après l'ensemencement de 10^5 cellules, la culture est clairsemée, les cellules étant très peu en contact avec leurs voisines.

Le temps nécessaire pour que 50 % des cellules se détachent variait de 9 à 30 minutes. 50 % des cellules de la lignée parentale se sont détachées en 9 minutes. Trois lignées se détachent très vite les F 9-4/6, F 9-4/11 et F 9-4/14 (50 % de détachement en 9, 9 et 10 minutes respectivement).

Les F 9-4/8, 17, 20, 21 et 23 se sont détachées entre 16 et 20 minutes et les F 9-4/9, 13, 18, 22 et 25 entre 22 et 30 minutes.

LA FIBRONECTINE.

La fibronectine a été étudiée *in vitro* par immunofluorescence. Des cultures de cellules sur lamelles de verre étaient marquées quand elles étaient clairsemées, subconfluentes et confluentes. L'aspect de la fibronectine a été noté et la quantité estimée de + à ++++ pour les cultures confluentes.

La planche 4 montre des images représentatives de cette classification reportée dans le tableau 9. Toutes les lignées exprimaient la fibronectine sous sa forme de filaments extracellulaires.

La quantité de fibronectine exprimée était très différente. La lignée F 9-4/8 (+) montre une image composée de filaments très courts et de nombreuses cellules négatives.

D'autres lignées, par exemple, F 9-4/13 (++++) montraient une matrice extracellulaire de fibronectine très bien développée. Les filaments étaient continus, recouvraient toutes les cellules et étaient très bien liés entre eux, formant un réseau. Les filaments de fibronectine suivaient en général l'axe longitudinal des cellules mais avec des liaisons fréquentes entre eux.

Dans les lignées classées ++ ou +++, la fibronectine était exprimée sous forme d'un réseau extracellulaire recouvrant la majorité des cellules, cependant les liaisons entre filaments étaient moins fréquentes et présentaient des discontinuités.

Les myotubules n'exprimaient pas de fibronectine sous forme de matrice extracellulaire quelle qu'en soit la quantité exprimée par les cellules myoblastiques. Ces myotubules présentaient par contre un marquage de la membrane sous forme d'un ensemble de grains dont la taille était du même ordre que le diamètre d'un noyau. Ce marquage est constitué d'un ensemble de petits points

.../...

formant une sorte de disque (Planche 4). Quand ces disques étaient présents, on en dénombrait de 1 à 5 par myotubules. L'image de disques a été retrouvée dans toutes les lignées qui se différenciaient bien. Dans les autres lignées elles n'ont pas toujours été retrouvées.

Un marquage semblable des myotubules normaux a été décrit par CHEN (57) sur la lignée myoblastique L6. Le marquage des récepteurs d'acéthylcholine avec le I^{125} bungarotoxine donne (58) une image semblable, plusieurs disques du diamètre d'un noyau par myotubule. Il ne serait pas illogique de supposer que ces deux sortes de disques sont l'image d'une même structure qui correspond géographiquement à la jonction neuromusculaire.

La fibronectine étant impliquée dans l'adhésion et le contact entre les cellules pourrait être un facteur important dans la liaison entre le nerf et la fibre musculaire.

EFFICACITE DE CLONAGE.

L'efficacité de clonage des lignées variait peu. Elle se situait entre 44 et 75 % des cellules ensemencées selon les lignées et selon les expériences. Il n'y a pas de différence significative entre les efficacités de clonage des diverses lignées. Ces lignées ont été isolées par un double clonage en milieu liquide et sont certainement adaptées à former des colonies en milieu liquide.

RELATIONS ENTRE LES DIVERS CARACTERES ETUDIES *IN VIVO* ET *IN VITRO*.

Tous les caractères étudiés ont montré une hétérogénéité, à l'exception de la durée de la deuxième phase de croissance. Donc on a pu chercher des corrélations entre ces caractères.

1 - Capacités métastatiques spontanées.

Le degré d'envahissement des poumons est directement lié au degré d'envahissement des ganglions lomboaortiques (Tableau 3) ($p < 0,05$ χ^2 de Yates).

2 - Capacités métastatiques spontanées et expérimentales.

Il existe une corrélation inverse entre le nombre de colonies pulmonaires induites par injection i.v. de cellules (Tableau 4) et le pourcentage de rats présentant des métastases lomboaortiques après injection s.c. de cellules (Tableau 3), ($p < 0,01$ χ^2 de Yates).

Il y a une tendance pour que le nombre de colonies pulmonaires soit inversement lié au nombre de métastases pulmonaires.

		Métastases pulmonaires	
		0-18	19-35
Colonies pulmonaires	0-10	2	6
	11-25	4	1

.../...

3 - DT50 et la durée de la première phase de croissance.

Quand les clones F 9-4/- de cette étude et les clones J 9-4/- (décrits dans l'article ci-joint) sont regroupés, on trouve une différence significative entre la durée moyenne de la première phase de croissance des clones à DT50 < 1000 et celle des clones à DT50 > 10 000 ($p < 0,05$ Student's t test).

4 - La durée de la première phase de croissance et le caryotype.

Il y a une relation inverse entre le nombre moyen de chromosomes par lignée et la durée de la première phase de croissance. Le coefficient de corrélation est $r = 0,661$ ($p < 0,02$).

5 - La fibronectine et les caractères étudiés in vivo.

Une corrélation a été trouvée entre la quantité de fibronectine exprimée de + à ++++ et le nombre moyen par rat de colonies pulmonaires provoquées par l'injection i.v. de cellules (Figure 6A). On s'aperçoit que les cellules ayant peu de fibronectine sont les moins colonisantes. Le coefficient de corrélation est $r = 0,601$ ($p < 0,05$).

Pour les autres paramètres (*in vivo* ou *in vitro*) l'étude de la fibronectine n'a pas permis de révéler des corrélations significatives. Ceci est peut être dû au fait que 9 des 13 lignées F 9-4/- possèdent une matrice extracellulaire de fibronectine assez bien développée (+++ ou ++++). La faible proportion de lignées classées + ou ++ rend difficile le calcul des corrélations possibles (Tableau 9). Cependant on peut constater certaines tendances en accord avec des résultats publiés par d'autres équipes ou pour lesquelles on peut trouver une explication logique.

Ces tendances sont :

a) - Les 4 lignées dont la fibronectine est classée + ou ++ (Tableau 9) sont dans le groupe DT50 < 1000, ainsi que 3 lignées classées +++ ou ++++.

.../...

Les 6 lignées dont la DT50 est intermédiaire ou élevée sont toutes classées +++ ou ++++ (Figure 6B) pour la fibronectine.

b) - Les lignées pauvres en fibronectine sont plutôt très métastasiantes au niveau des ganglions lomboaortiques.

Les 4 lignées classées + ou ++ pour leur fibronectine provoquent 50 % ou plus de métastases lomboaortiques après injection s.c. (Figure 6C).

Parmi les 9 lignées classées +++ ou ++++, 4 provoquent moins de 50 % de métastases lomboaortiques alors que les 5 autres en induisent plus de 50 %.

La comparaison du nombre des métastases pulmonaires spontanées et de l'expression de la fibronectine donne une image beaucoup moins claire (Figure 6D).

Les 2 lignées + sont très peu métastasiantes. Les 2 lignées ++ sont très métastasiantes et les lignées +++ ou ++++ sont dispersées quant à leur pouvoir métastasiant.

6 - La sensibilité au détachement par la trypsine et la fibronectine.

Il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres. Mais on peut dire que les lignées ayant peu de fibronectine se détachent moins vite sous l'action de la trypsine que certaines des lignées riches en fibronectine (Figure 6E).

TABLEAU 1 - LA TUMORIGENICITE DES LIGNEES APRES INJECTION SOUS-CUTANEE

LIGNEE	DT50[1] (nombre de cellules)	GROUPE[2]
9-4/0	3 100	Intermédiaire
F 9-4/6	2 800	Intermédiaire
8	< 1 000	Forte
9	1 000	Forte
11	< 1 000	Forte
13	2 400	Intermédiaire
14	2 000	Intermédiaire
17	1 000	Forte
18	80 000	Faible
20	4 000	Intermédiaire
21	< 1 000	Forte
22	< 1 000	Forte
23	< 1 000	Forte
25	> 1 000 < 10 000	Intermédiaire

1 - Chiffres calculés par analyse probite des nombres de rats avec tumeurs pour chaque dose de cellules injectées.

2 - Répartition des tumorigénicités en trois groupes :

. forte : DT50 < 1 000

. intermédiaire : DT50 > 1 000 < 10 000

. Faible : DT50 > 10 000

TABLEAU 2 - LES DEUX PHASES DE CROISSANCE [1]

LIGNEE	1ère PHASE[2] (jours)	2ème PHASE[3] (jours)
9-4/0	30	34
F 9-4/6	47	24
8	37	30
9	53	25
11	45	29
13	76	31
14	40	26
17	35	21
18	93	28
20	60	29
21	47	27
22	43	32
23	32	27
25	44	20

1 - Les deux phases sont données pour une dose arbitraire de 5×10^4 cellules injectées (voir résultats)

2 - Le temps en jours nécessaire à la croissance d'une tumeur dès l'injection jusqu'à un diamètre de 15 mm

3 - Le temps en jours nécessaire à la croissance d'une tumeur d'un diamètre de 15 mm jusqu'à un diamètre de 30 mm.

TABLEAU 3 - CAPACITES METASTATIQUES SPONTANEES APRES INJECTION S.C. DES LIGNEES CELLULAIRES

GNEES	Diamètre moyen des tumeurs $\bar{m} \pm SE$	Nombre d'autopsies	METASTASES PULMONAIRES		POURCENTAGE DE RATS PORTANT DES METASTASES GANGLIONNAIRES					% de Rats portant des métastases médiastinales
			% de rats	$\bar{m} \pm SE$	Inguinal axillaire ipsolateral		Inguinal axillaire contralatéral		Lombo-aortique	
9-4/0	40 ± 1,7	15	80	9 ± 2,1	73	67	10	0	40	80
9-4/6	50 ± 1,9	14	100	35 ± 4,3	86	43	14	0	43	77
8	45 ± 1,6	16	80	10 ± 2,6	81	63	19	6	50	40
9	47 ± 1,6	14	100	28 ± 5,9	100	86	36	21	100	29
11	49 ± 2,2	16	100	20 ± 2,3	94	63	6	0	75	25
13	46 ± 2,0	18	94	12 ± 2,3	89	61	6	0	17	22
14	45 ± 1,2	15	93	14 ± 1,8	93	67	7	0	40	47
17	50 ± 1,1	16	100	23 ± 2,1	100	38	19	0	94	56
18	45 ± 1,5	7	86	23 ± 9,7	100	100	43	14	100	14
20	44 ± 2,4	11	82	18 ± 5,5	100	100	36	9	64	27
21	52 ± 1,8	14	100	19 ± 3,1	100	43	14	0	76	36
22	51 ± 1,5	19	90	13 ± 2,9	100	63	11	0	74	21
23	46 ± 1,4	19	100	13 ± 2,0	84	63	53	0	32	42
25	52 ± 1,6	14	86	21 ± 6,1	93	71	43	14	79	21

TABLEAU 4 - CAPACITES METASTATIQUES EXPERIMENTALES APRES INJECTION I.V. DES LIGNEES CELLULAIRES[1].

Lignées	Nombre de colonies pulmonaires $\bar{m} \pm SE$	Nombre de rats portant des colonies extrapulmonaires[4]	p[3]
9-4/0 (18)[2]	7 ± 3,2		
F 9-4/8 (10)	1 ± 0,2		NS
9 (10)	7 ± 0,9		NS
18 (10)	4 ± 2,1		NS
21 (10)	4,5 ± 2,2	1 M.	NS
25 (10)	3,5 ± 1,1	1 M.	NS
22 (10)	4 ± 0,9	1 M.	NS
17 (10)	6 ± 1,6	5 M.	NS
11 (9)	6 ± 2,3	1 G.L	NS
23 (8)	17 ± 3,1	6 M.	< 0,10
14 (6)	19 ± 2,3	5 M.	< 0,001
6 (10)	18 ± 4,2	8 M.	< 0,05
20 (10)	20 ± 3,9	8 M. 2 intestinales 2 dorsales s.c. 1 cuisse s.c.	< 0,02
13 (10)	22 ± 5,9	8 M.	< 0,02

1 - On a dénombré les colonies pulmonaires apparentes à la surface des poumons 10 semaines après l'injection i.v. de 10^5 cellules.

2 - Entre parenthèses : le nombre de rats par groupe

3 - Probabilité de non différence de la lignée parentale (Student's t test)

4 - M = médiastin : G.L = ganglions lomboaortiques

TABLEAU 5 - LA CROISSANCE *IN VITRO*.

Lignées	Temps de doublement (Heures)[1]	Densité de Saturation (cellules/cm^2)[1]
9-4/0	23	$2,3 \times 10^5$
F 9-4/6	15	$2,6 \times 10^5$
8	21	$1,5 \times 10^5$
9	18	$2,4 \times 10^5$
11	20	$1,8 \times 10^5$
13	18	$3,8 \times 10^5$
14	21	$3,3 \times 10^5$
17	22	$1,3 \times 10^5$
18	17	$1,3 \times 10^5$
20	20	$1,7 \times 10^5$
21	27	$1,3 \times 10^5$
22	30	$0,9 \times 10^5$
23	18	$2,4 \times 10^5$
25	18	$2,9 \times 10^5$

1 - Ces données sont calculées à partir des courbes de croissance établies *in vitro*.

TABLEAU 6 - LA DIFFERENCIATION EN MYOTUBULES *IN VITRO*

Lignées	Présence de myotubules[1]
9-4/0	+
F 9-4/6	+
8	+
9	-
11	++
13	++++
14	-
17	+++
18	+
20	+
21	++++
22	++++
23	+
25	+

1 - Des images représentatives de cette classification sont fournies sur la planche 3.

TABLEAU 7 - LE NOMBRE DE CHROMOSOMES PAR MITOSES DE CHAQUE LIGNEE

LIGNEES	NOMBRE DE CHROMOSOMES	ECART
	Moyenne[1] ± écart type	
9-4/0	72,8 ±	24-125
F 9-4/6	86,5 ± 10,4	32-98
8	84,1 ± 21,6	28-106
9	83,5 ± 7,4	45-94
11	96,6 ± 3,4	86-104
13	42,3 ± 15,0	11-62
14	94,0 ± 8,8	51-107
17	87,3 ± 22,4	18-118
18	72,1 ± 16,0	13-93
20	55,0 ± 27,2	12-95
21	71,5 ± 10,9	29-84
22	80,6 ± 7,0	51-91
23	88,8 ± 9,7	52-112
25	89,0 ± 10,3	61-106

1 - Le nombre de chromosomes était déterminé pour 50 mitoses par lignée.

Histogramme montrant la distribution du nombre de chromosomes par mitoses de trois lignées.

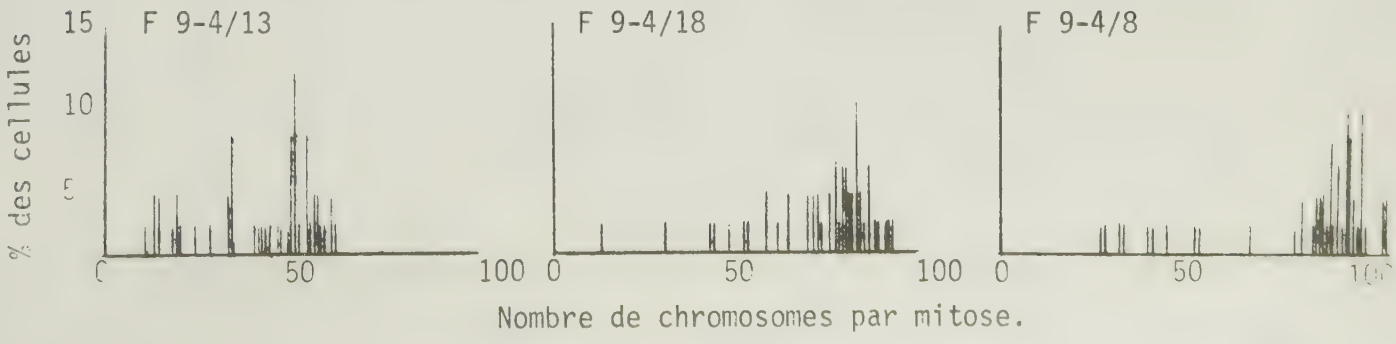


TABLEAU 8 - SENSIBILITE DES CELLULES AU DETACHEMENT PAR LA TRYPSINE

LIGNEES	TEMPS MOYEN[1] (mn)	ECART[2] (mn)
9-4/0	9	8-9
F 9-4/6	9	9-9
8	20	18-22
9	30	29-30
11	9	7-11
13	25	22-29
14	10	6-15
17	20	18-22
18	23	17-29
20	17	17-17
21	17	12-22
22	22	17-27
23	16	15-18
25	26	20-33

1 - Temps nécessaire au détachement de 50 % des cellules.

2 - Résultats des expériences individuelles.

Deux courbes de détachement

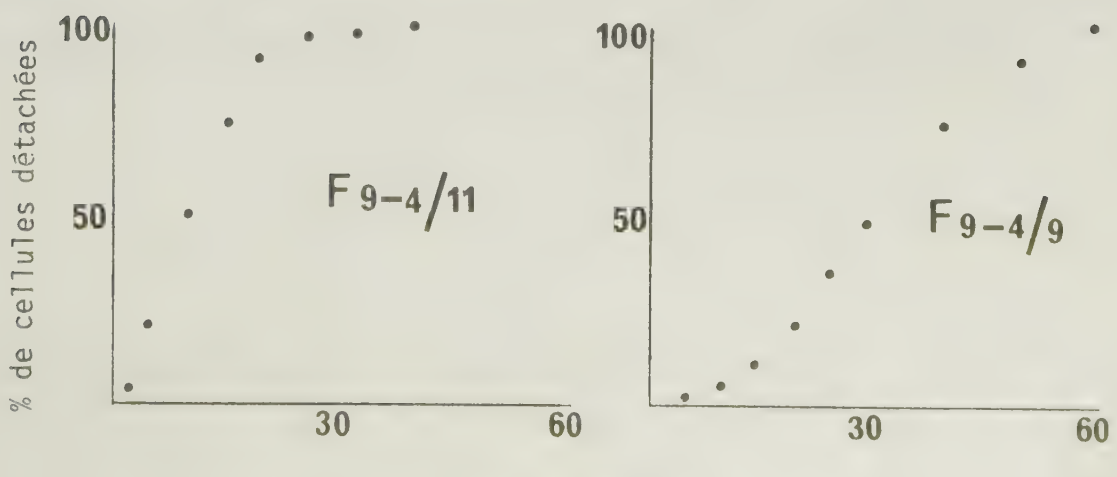


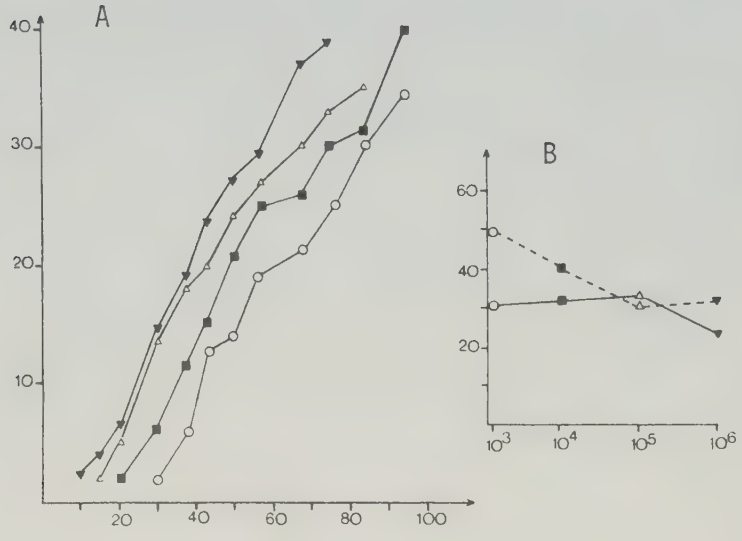
TABLEAU 9 - LA FIBRONECTINE EXPRIMEE PAR LES CELLULES *IN VITRO*[1]

LIGNEES	CELLULES EN CULTURE			PRESENCE DE DISQUES[2]
	CLAIRSEMEES	SUBCONFLUENTES	CONFLUENTES	
9-4/0	-	+	+++	x
F 9-4/6	+	++	+++	
8	-	+	+	
9	-	+	++	
11	+	++	+++	
13	+	++	++++	x
14	+	++	++++	
17	+	++	++++	x
18	-	+	+++	x
20	+	++	+++	
21	-	+	++	x
22	-	+	+	x
23	+	++	++++	
25	-	+	+++	

1 - Voir planche 4 qui montre des images représentatives de la classification + à ++++ de la quantité de fibronectine.

2 - Des marquages sous forme de disques observés sur les myotubules.

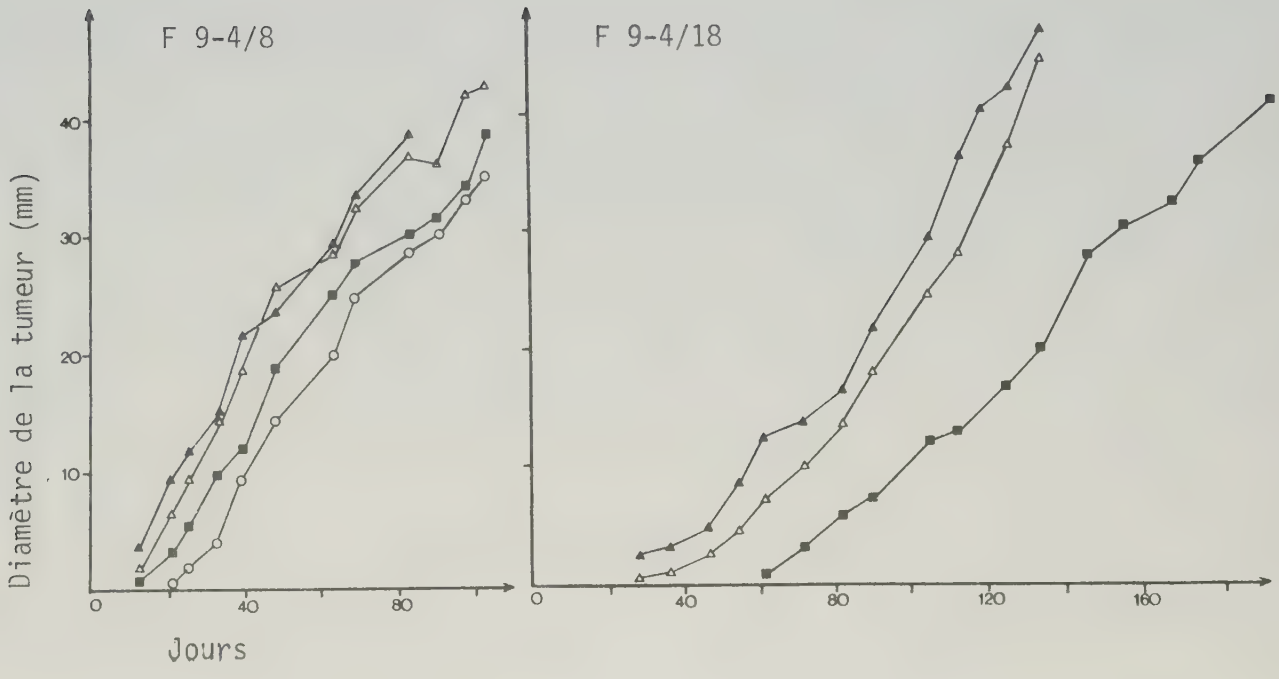
FIGURE 1 - COURBES ET PHASES DE CROISSANCE DE LA LIGNEE PARENTALE 9-4/O



1.A - Courbes de croissance des tumeurs induites par injection s.c. des cellules parentales 9-4/O. Doses de cellules injectées, ▼ - 10^6, △ - 10^5, ■ - 10^4, ○ - 10^3.

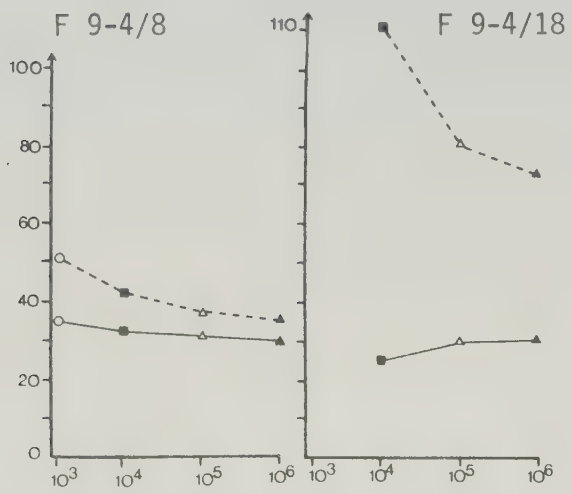
1.B - Phases de croissance. ----- la première phase se mesure par le nombre de jours qui séparent l'injection des cellules de l'apparition d'une tumeur de 15 mm de diamètre. La deuxième se mesure par le temps nécessaire à la croissance d'une tumeur de 15 mm de diamètre jusqu'à 30 mm de diamètre.———

FIGURE 2 - COURBES DE CROISSANCE DE DEUX DES LIGNEES :
F 9-4/8 et F 9-4/18.



Courbes de croissances des tumeurs après injection s.c. de cellules au jour 0.
Les symboles représentent le nombre de cellules injectées
o - 10^3, ■ - 10^4, △ - 10^5, ▲ - 10^6.

FIGURE 3 - PHASES DE CROISSANCE DE DEUX LIGNEES : F 9-4/8 et F 9-4/18

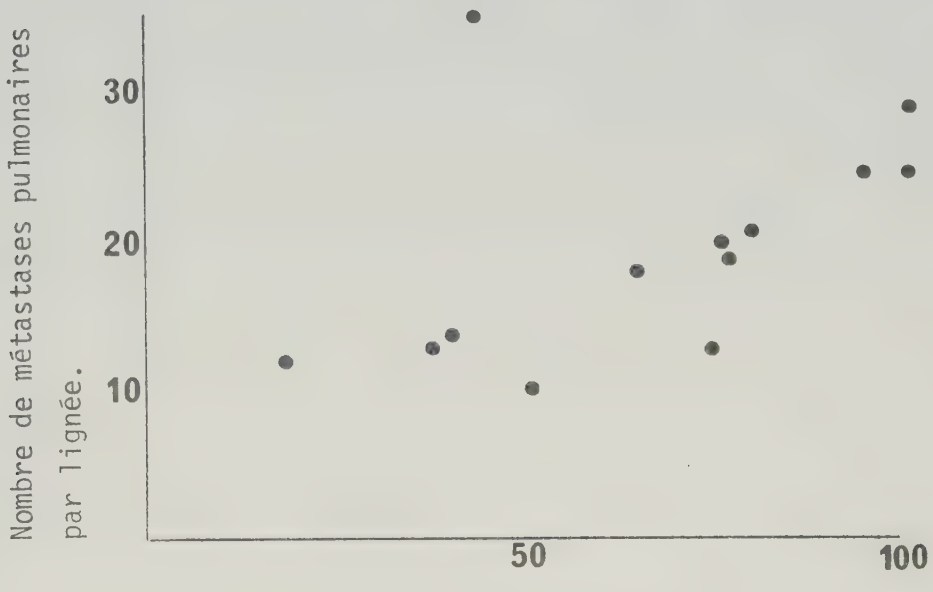


----- première phase de croissance. Nombre de jours qui séparent l'injection des cellules de l'apparition d'une tumeur de 15 mm de diamètre.

——— Deuxième phase : temps nécessaire à la croissance d'une tumeur de 15 mm jusqu'à un diamètre de 30 mm

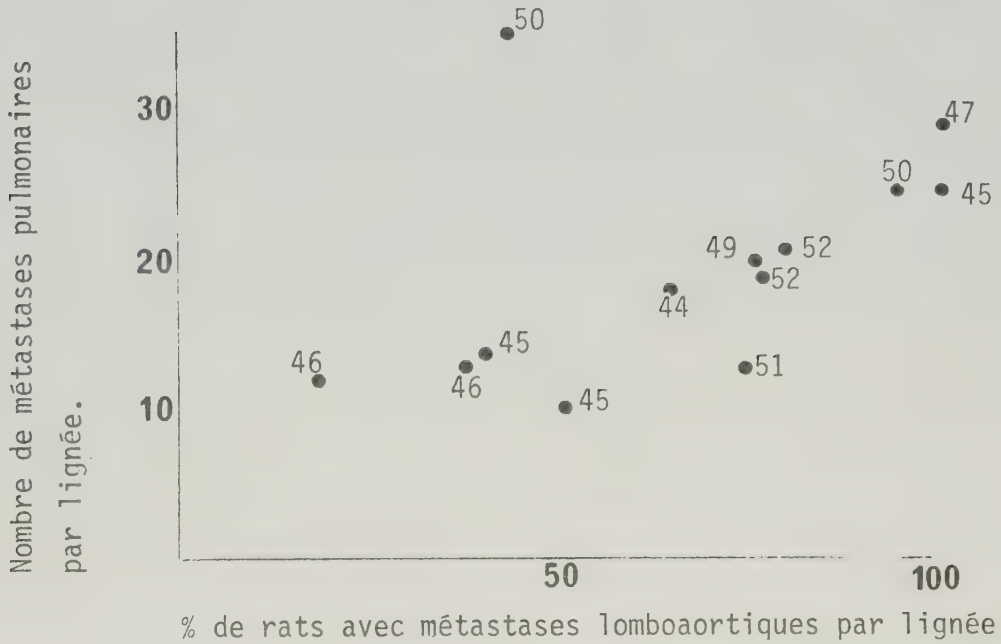
Doses de cellules injectées ○- 10^3, ■ - 10^4, △ - 10^5, ▲ - 10^6

FIGURE 4 - RELATION ENTRE LE NOMBRE MOYEN DE METASTASES PULMONAIRES ET LE POURCENTAGE DE RATS AVEC METASTASES LOMBOAORTIQUES POUR L'ENSEMBLE DES LIGNEES.



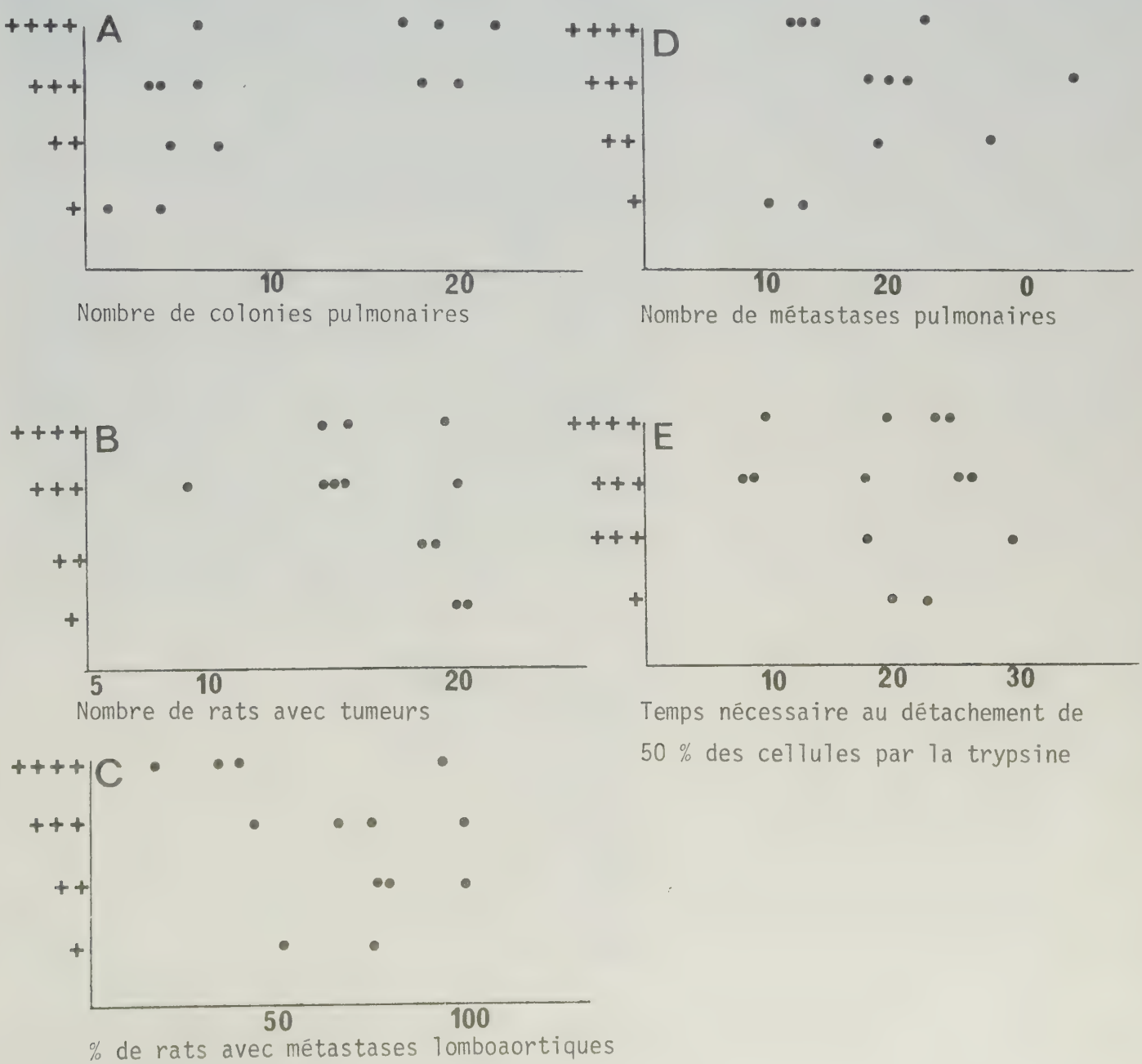
Chaque point représente les capacités métastatiques d'une lignée.

FIGURE 5 - RELATION ENTRE LA TAILLE MOYENNE DES TUMEURS A L'AUTOPSIE ET L'INVASION METASTATIQUE.



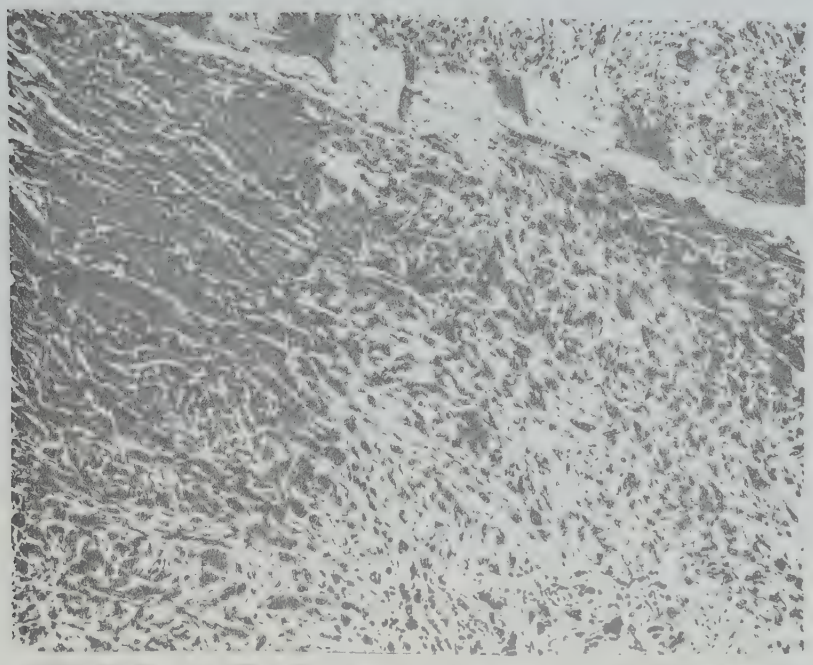
Le chiffre accompagnant chaque point représente la taille moyenne mesurée à l'autopsie des tumeurs induites par chaque lignée.

FIGURE 6 - RELATIONS ENTRE LA QUANTITE DE FIBRONECTINE ESTIMEE *IN VITRO* ET DIFFERENTS CARACTERES DES LIGNEES CLONEES.

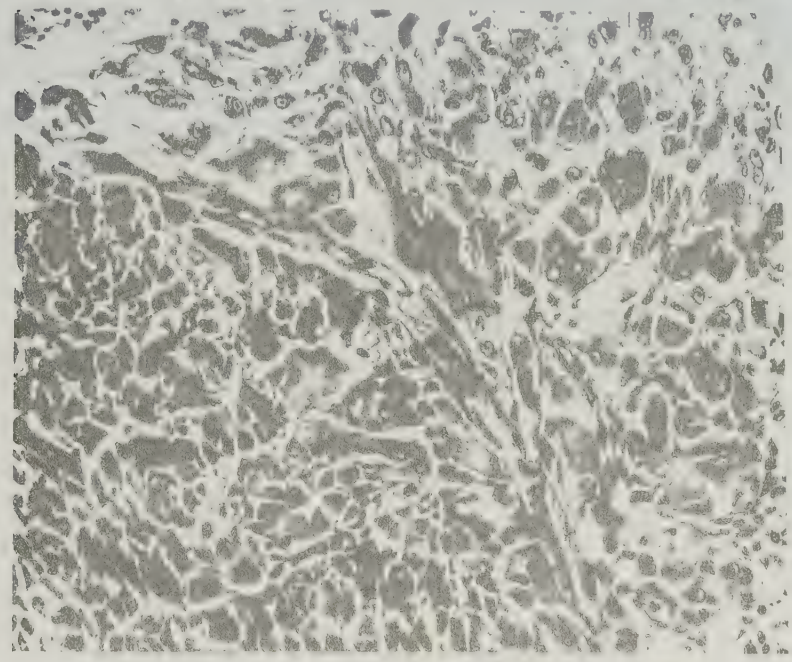


Chaque point représente une lignée.

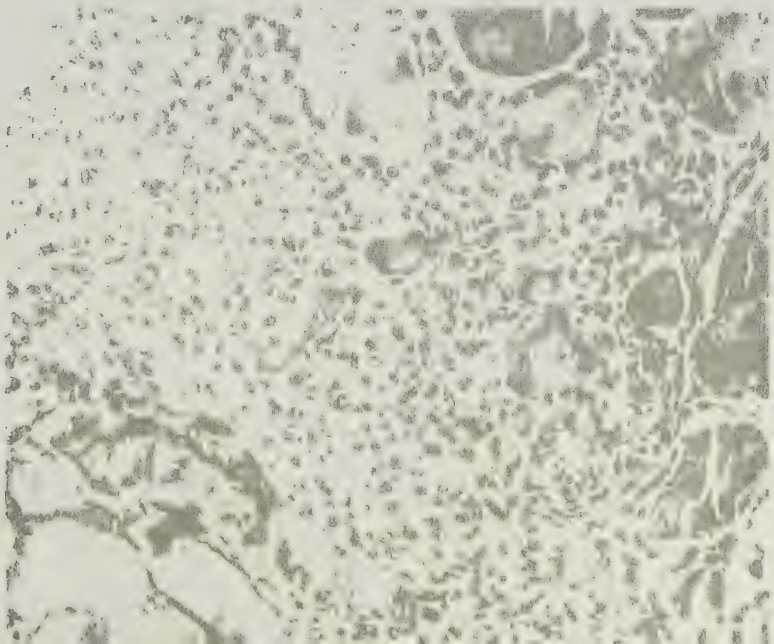
PLANCHE 1 - L'ASPECT HISTOLOGIQUE DES TUMEURS



Vues générales de
la tumeur avec cellules
multinuclées
x 80

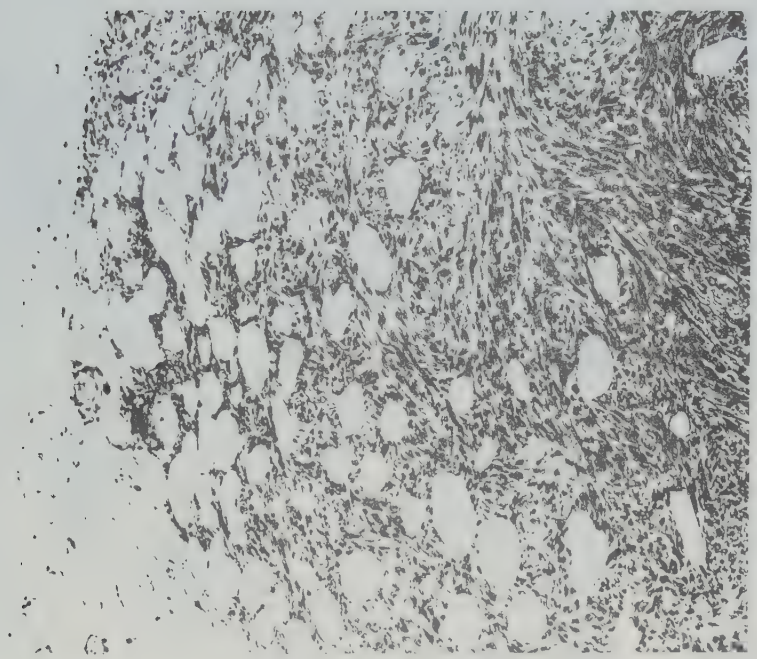


x 200

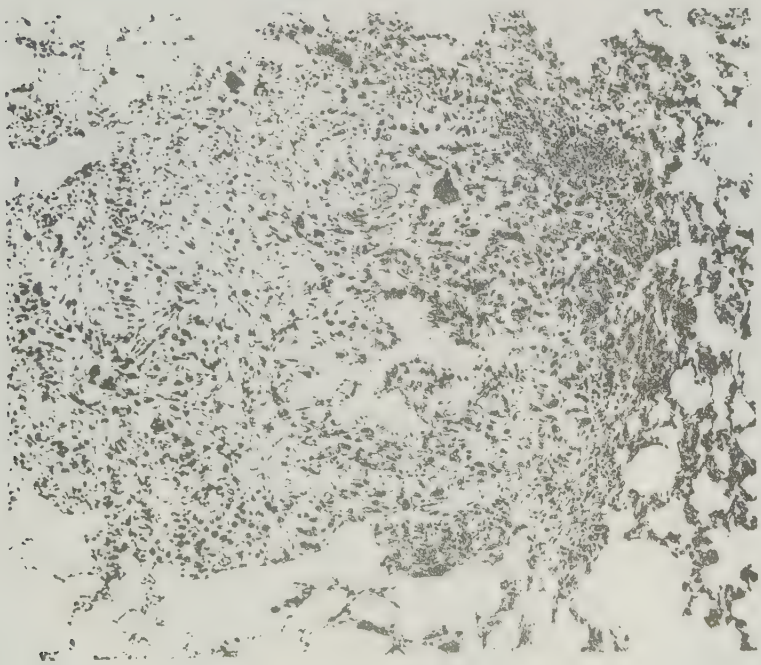


Les cellules tumorales
envahissant le muscle
normal
x 200

PLANCHE 2 - ASPECT HISTOLOGIQUE DES METASTASES

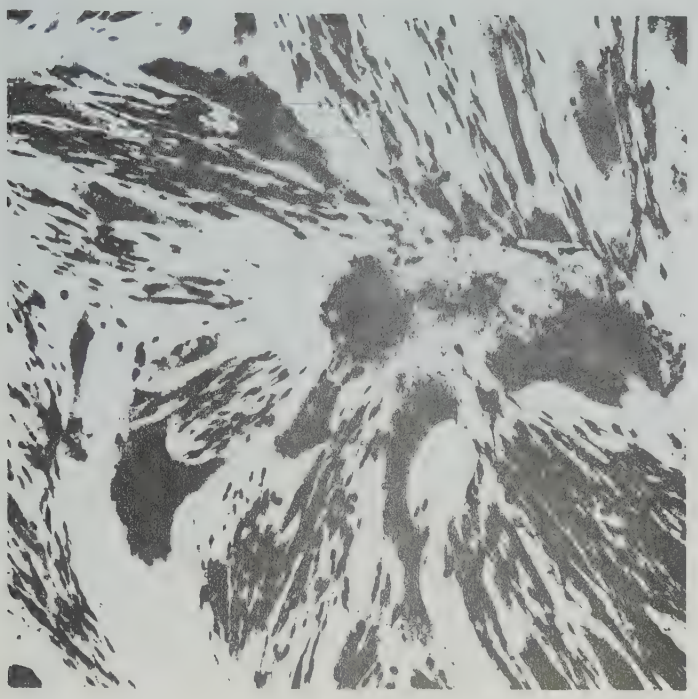


Une métastase
ganglionnaire
x 80



Une métastase
pulmonaire
x 80

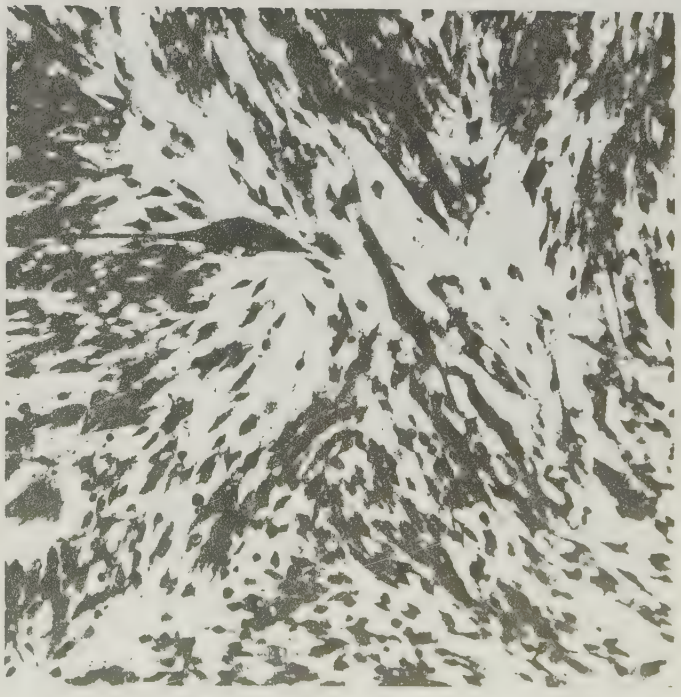
PLANCHE 3 - LA CLASSIFICATION PAR CROIX DE LA DIFFERENCIATION EN MYOTUBULES



++++

+++

++



+

×80

PLANCHE 4 - LA CLASSIFICATION PAR CROIX DE LA FIBRONECTINE

++++

+++

++

+

×450

DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce travail démontrent clairement l'hétérogénéité du comportement de lignées clonées d'une même tumeur. L'étude des corrélations entre le pouvoir malin *in vivo* et les caractéristiques biologiques des lignées définies *in vitro* permet de déterminer leur degré de liaison.

Treize lignées clonées ont été dérivées de la culture d'un rhabdomyosarcome primaire induit par injection i.m. de nickel chez le rat. Ces lignées montrent une hétérogénéité quant à leur tumorigénicité, leur croissance et leurs capacités métastatiques spontanées et expérimentales. La démonstration de cette hétérogénéité a permis d'envisager la recherche *in vitro* de caractères biologiques liés au pouvoir malin *in vivo* des lignées. Les caractères suivants ont été étudiés *in vitro* :

- l'expression de la matrice extracellulaire de fibronectine
- le détachement sous l'influence de la trypsine
- le caryotype
- la croissance

.../...

Vis à vis de ces caractères les lignées sont également hétérogènes. La comparaison de ces lignées dont l'hétérogénéité a été démontrée *in vitro* et *in vivo* a révélé un certain nombre de corrélations ou de tendances.

L'hypothèse fondamentale de ce travail est que :

- il existe une relation inverse entre la capacité métastatique spontanée (après injection s.c. de cellules et la croissance d'une tumeur) et la capacité métastatique expérimentale (après injection i.v. de cellules),
- cette relation inverse est liée aux caractères d'adhésion des cellules : expression d'une matrice extracellulaire de fibronectine et facilité du détachement sous l'influence de la trypsine.

Bien que non significative, une relation inverse semble exister entre le nombre de métastases pulmonaires spontanées et le nombre de colonies pulmonaires. Cette tendance est vérifiée par la relation inverse significative trouvée entre les métastases spontanées aux ganglions lomboaortiques et les colonies pulmonaires. La relation entre les métastases lomboaortiques spontanées et les métastases pulmonaires spontanées est directe et significative. Cette évidence indique que, au moins pour ce modèle, une lignée très colonisante donne lieu à peu de métastases spontanées et qu'une lignée peu colonisante donne lieu à un grand nombre de métastases spontanées.

Sur des lignées du mélanome B16 STACKPOLE (61) a trouvé également une relation inverse entre les pouvoirs métastatiques spontanés et expérimentaux. Il a démontré que les lignées B16 F1 et B16 F10 sélectionnées par passages successifs *in vivo* (voie i.v. F1 1er passage, F10 10ème passage) sont toutes les deux colonisantes et peu métastasiantes. A l'inverse, FIDLER, (12) utilisant les lignées B16 F1, F5 et F11, a trouvé une relation directe entre les deux types de métastases. KRIPKE et al., (14) qui ont étudié des lignées clonées d'un fibrosarcome murin ont aussi trouvé cette relation.

.../...

Les divergences entre nos résultats et ceux de STACKPOLE (61) d'une part et les résultats de FIDLER (19) et KRIPKE et al., (14) de l'autre, peuvent être liées aux protocoles expérimentaux utilisés. En effet, dans nos expériences, aucune intervention chirurgicale n'a eu lieu entre l'injection des cellules et la mort de l'animal, alors que FIDLER (19) a procédé à l'ablation des tumeurs dix jours après l'injection des cellules tumorales, les animaux étant autopsiés six à huit semaines plus tard. STACKPOLE (61) a montré que l'ablation des tumeurs peut entrainer une élévation du nombre de métastases. Il suggère que ce phénomène est dû à l'introduction accidentelle de cellules tumorales dans la circulation pendant l'intervention chirurgicale. Ces cellules introduites dans la circulation sanguine sont l'équivalent des cellules injectées par voie i.v. et donnent lieu à des métastases "expérimentales" surtout s'il s'agit d'une lignée très colonisante. Ces métastases sont considérées à l'autopsie comme étant des métastases spontanées. Il en résulte une capacité métastatique spontanée artificiellement élevée, qui peut expliquer la différence entre nos résultats et ceux de FIDLER (19). KRIPKE et al., (14) ont utilisé un protocole identique au nôtre, c'est-à-dire sans intervention chirurgicale et ils ont observé une relation directe. Cette différence entre nos résultats et les leurs peut être due au fait qu'ils ont employé un autre modèle tumoral et que cette tumeur avait été passée par greffe *in vivo* avant d'être mise en culture et clonée.

Dans le but d'expliquer la relation inverse que nous avons trouvée entre les capacités métastatiques spontanées et expérimentales, on a mis en évidence *in vitro* la formation d'une matrice extracellulaire de fibronectine et la cinétique de détachement des cellules sous l'influence de la trypsine.

.../...

Les relations entre les capacités métastatiques et la quantité estimée de fibronectine (Figure 6) mettent en évidence une influence partielle de cette protéine sur le processus métastatique. La quantité de fibronectine est liée ($p < 0,05$) au nombre de colonies pulmonaires dues à l'injection i.v. de cellules. Les lignées ayant une matrice de fibronectine peu développée ont formé peu de colonies pulmonaires. Par contre, la liaison entre la quantité de fibronectine et la capacité métastatique spontanée est beaucoup moins évidente. On peut constater que les quatre lignées pauvres en fibronectine (+ ou ++) ont induit plus de 50 % de métastases lomboaortiques et que parmi les quatre lignées très riches en fibronectine (++++) trois en ont induit moins de 50 %. Cependant aucune liaison ou tendance n'apparait quand on compare le nombre de métastases pulmonaires spontanées à la quantité estimée de fibronectine.

Ces résultats mettent en évidence le rôle de la fibronectine dans l'augmentation du nombre de métastases expérimentales, sont ils liés à l'influence de cette protéine sur l'adhésion des cellules ? Ces cellules ont été trypsinisées peu avant l'injection i.v. et n'ont pas à ce moment de matrice extracellulaire de fibronectine. Les cellules sont arrondies, en suspension et de plus la fibronectine est très sensible à la trypsine (38). S'il y a une influence précoce de la fibronectine alors que les cellules tumorales se trouvent dans le sang, cette fibronectine devrait être la fibronectine plasmatique de l'hôte. Elle pourrait contribuer à la formation d'embols entre les cellules tumorales et des constituants sanguins de l'hôte tels que les plaquettes et les lymphocytes ou entre les cellules elles-mêmes. Il est possible que des cellules capables de former une matrice extracellulaire *in vitro* aient une capacité accrue d'accumuler la fibronectine exogène à leur surface dans la circulation sanguine. Di LUZIO et al., (62) ont montré une diminution

.../...

de la fibronectine plasmatique après injection i.v. de cellules leucémiques. YAMADA et al., (63) ont montré que l'addition de fibronectine augmente l'aggrégation *in vitro* d'érythrocytes fixés au formol ou de cellules embryonnaires de poulet. En présence de fibronectine plasmatique purifiée, l'attachement de cellules au support *in vitro* ne nécessite pas de synthèse *de novo* de protéines (64) même après l'action de la trypsine (64, 65). Les récepteurs cellulaires de la fibronectine sont donc insensibles à la trypsine.

En considérant l'ensemble de ces résultats, il est possible que les cellules injectées par voie i.v. aient utilisé la fibronectine plasmatique pour former des aggrégats ou pour adhérer plus directement au site métastatique. Il est connu que les aggrégats de cellules se logent plus facilement dans les capillaires (66,67). Si les lignées qui ont une matrice extracellulaire bien développée possèdent plus de récepteurs pour la fibronectine que les lignées à matrice peu développée, elles utiliseraient mieux la fibronectine plasmatique de l'hôte pour former ainsi plus de colonies pulmonaires que les cellules pauvres en fibronectine. Dans les expériences de NICOLSON et al., (68) la pré-incubation de couches de cellules endothéliales avec des anticorps anti-fibronectine, n'a pas inhibé l'adhésion des lignées B16 F1, et B16 F10 à ces cellules, et a diminué légèrement l'attachement de ces lignées aux membranes basales. Ces expériences n'excluent pas un rôle majeur de la fibronectine dans la fixation de cellules tumorales au site métastatique. Les cellules du mélanome B16 produisent peu de fibronectine d'elles mêmes (68) et les expériences de NICOLSON et al., (68) ont été conduites dans l'absence de fibronectine soluble. La fibronectine soluble améliore l'adhésion de cellules à divers substrats *in vitro* et en particulier au collagène (31, 32, 69). Si la fibronectine exogène du plasma intervient essentiellement pour parfaire

.../...

l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire, la fibronectine des cellules endothéliales aurait un rôle moins important, et les cellules tumorales interviendraient uniquement dans le sens où, capables de produire une matrice extracellulaire abondante de fibronectine, elles produiraient corrélativement une grande quantité de récepteurs pour la fibronectine exogène.

Le rôle de la fibronectine dans la dissémination métastatique n'a pas été mis en évidence. Néanmoins, les quatre lignées pauvres en fibronectine (+ ou ++) sont plus métastasiantes aux ganglions lomboaortiques que trois des quatre lignées classées ++++. CHEN et al., (34) ont suggéré qu'une liaison entre l'absence de fibronectine et la production de métastases par des lignées transformées par le SV 40 existe. Mais toutes leurs lignées riches en fibronectine qui n'ont induit que des tumeurs bénignes, étaient issues de souris. Les lignées pauvres en fibronectine et métastasiantes étaient issues de hamster. Une telle comparaison entre deux espèces est difficile à interpréter. Dans ces études CHEN et al., (34) ont aussi étudié la fibronectine *in vitro*. L'apparition des métastases spontanées est plus éloignée du moment de l'injection s.c. et donc de l'état *in vitro* des cellules que ne l'est l'apparition des métastases expérimentales après injection i.v. de cellules. NERI et al., (70) ont trouvé que l'expression *in vitro* de la fibronectine était proportionnelle à l'expression *in vivo* dans des tumeurs induites par injection s.c. des lignées d'un adénocarcinome de rat. Ils n'ont pas trouvé de corrélation entre la quantité de fibronectine estimée *in vivo* ou *in vitro* et la capacité métastatique de leurs cellules. Les métastases et la tumeur d'origine avaient la même expression de fibronectine : soit, la formation de beaucoup de fibronectine par la tumeur et par les métastases, soit l'inverse. Deux lignées établies à partir de métastases pulmonaires exprimaient peu de fibronectine (70).

.../...

SMITH et al., (71) ont trouvé également que des lignées de carcinomes établies à partir de métastases exprimaient moins de fibronectine que des lignées établies à partir de tumeurs primaires. CHEN et al., (72) ont constaté que parmi 19 lignées de cellules de rongeurs transformées par virus 6 exprimaient une matrice de fibronectine *in vitro* alors que seulement une montrait la présence de fibronectine *in vivo*. ASCH et al., (83) ont étudié des cellules épithéliales mammaires. Ces cellules normales ou malignes formaient une matrice de fibronectine de façon semblable *in vitro* et *in vivo*. Dans ce travail les cultures primaires de cellules tumorales étaient négatives après marquage par un anti-sérum anti-fibronectine, alors que les cellules tumorales étaient positives, STAMPFER et al., (84) dans une étude sur les cellules humaines ont trouvé les cellules épithéliales normales ou malignes positives pour la fibronectine *in vitro* et *in vivo*. L'organisation de la fibronectine était moins développée chez les cellules malignes, toutes montraient un marquage de points sur la membrane, alors que les cellules normales ont formé une membrane basale où se trouvait la fibronectine.

Le rôle de la fibronectine dans la dissémination métastatique, par son influence sur l'adhésion des cellules, reste à démontrer. Si nos résultats obtenus *in vitro* sont indicatifs de la production de fibronectine *in vivo* ainsi que la majorité des travaux exposés ci-dessus, on peut conclure que cette influence n'est pas importante ou tout au moins qu'elle est masquée par d'autres paramètres plus déterminants. La fibronectine n'est ni la seule molécule intervenant dans l'adhésion des cellules ni la seule à diminuer après la transformation maligne. Le collagène joue un rôle important dans la formation de matrices extracellulaires et de membranes basales, sa synthèse est diminuée après la transformation maligne (85, 86). Les glycosaminoglycans sulphatés jouent peut être un rôle dans l'adhésion, leur synthèse est également diminuée après la transformation (86).

.../...

La sensibilité des cellules au détachement sous l'influence de la trypsine n'était pas liée aux autres propriétés étudiées. On considère ce caractère comme un indicateur de l'intensité de l'adhésion des cellules à la matière plastique. Il se peut que les cellules qui se sont détachées lentement en présence de la trypsine ont synthétisé davantage de liaisons entre elles-mêmes et le plastique. Nos résultats montrent que les lignées pauvres en fibronectine se sont détachées plus lentement que certaines des lignées riches en fibronectine. Elles ont certainement une matrice extracellulaire composée d'éléments moins sensibles à la trypsine que ne l'est la fibronectine.

HART (73) a montré que la lignée très envahissante B16-BL6 s'est détachée plus vite de son support que la lignée très colonisante B16-F10. VARANI et al., (74) ont démontré que le détachement d'une lignée très maligne de fibrosarcome était moins rapide. Mais il est difficile de déterminer d'après les protocoles employés par ces auteurs, le nombre de cellules présentes et disponibles pour le détachement. Il reste à démontrer que des expériences sur le détachement des cellules sous l'influence de la trypsine peuvent fournir des informations utiles sur le caractère des cellules métastasiantes.

On peut conclure de nos résultats qu'il existe :

- une relation inverse entre la capacité métastatique spontanée et la capacité métastatique expérimentale,
- que les cellules pauvres en fibronectine *in vitro* induisent peu de colonies pulmonaires,
- que l'expression de la fibronectine *in vitro* n'a pas d'influence majeure sur la capacité métastatique spontanée.

La dissémination métastatique spontanée est certainement un phénomène plus complexe que le processus de colonisation après injection i.v. La

.../...

cellule doit non seulement survivre aux rigueurs du transport dans le sang ou la lymphe, mais elle doit aussi arriver à s'échapper de la tumeur. Elle doit donc se dissocier de ses voisines, traverser plusieurs barrières tels les membranes basales et l'endothélium capillaire, tout en évitant la surveillance immunitaire de l'hôte.

Les cellules qui métastasent spontanément pourraient avoir besoin d'un appareil protéolytique bien développé. En effet, des cellules transformées ou tumorales produisent souvent des niveaux élevés de protéases (75, 76, 77). D'ailleurs, WANG et al., (78) ont trouvé une activité fibrinolytique plus élevée chez la lignée B16 F10 (très colonisante) que chez la lignée B16 F1 (moins colonisante). Ils ont suggéré que cette activité devrait s'atténuer au moment de l'attachement sur le site métastatique. Une augmentation d'activité fibrinolytique peut s'exprimer par une diminution de la formation de colonies pulmonaires après injection i.v. de cellules (79, 80, 81). LIOTTA et al., (93) ont démontré que la lignée B 16 BL6 dégrade davantage un substrat de collagène IV que la lignée B16 F10. De plus, la lignée B16 BL6 a provoqué plus de métastases spontanées et moins de métastases expérimentales que la lignée B16 F10 dont elle est dérivée (16).

Il est possible que les propriétés requises à une cellule pour quitter une tumeur ne soient ni les mêmes que, ni entièrement compatibles avec, celles nécessaires à sa fixation au site métastatique.

L'échappement de la tumeur demande peut être à la cellule une activité protéolytique élevée afin de lui permettre de traverser les barrières successives qui la séparent de la circulation. Mais une cellule ayant une activité protéolytique élevée dégraderait le substrat d'adhésion au site métastatique au lieu de s'y coller. Tenant compte d'une probabilité de fixation, fonction de cette activité protéolytique, un tel phénomène aurait pour effet de diminuer le nombre de métastases expérimentales, en diminuant des propriétés

.../...

d'adhésion des 100 000 cellules injectées, et d'augmenter le nombre de métastases spontanées en augmentant considérablement le nombre de cellules tumorales dans la circulation. A l'inverse des cellules adhérentes provoqueraient davantage de colonies pulmonaires mais peu de métastases spontanées parce qu'il n'y aurait qu'un petit nombre de cellules tumorales dans la circulation. Ce schéma explique la relation inverse qui existe entre les deux types de métastases.

L'influence de la fibronectine sur la capacité colonisante a été démontrée. Il reste à approfondir notre connaissance de cette influence et de rechercher le rôle des enzymes protéolytiques de ces cellules dans la dissémination métastatique.

Les autres caractères étudiés *in vitro* et *in vivo* ne montrent pas de relation significative avec les pouvoirs métastatiques. Mais des relations existent entre la tumorigénicité et la quantité de fibronectine estimée *in vitro* d'une part et entre le caryotype et la durée de la première phase de croissance des tumeurs de l'autre. Par contre, la croissance *in vitro* n'a pas de relation avec la croissance *in vivo*. La différenciation en myotubules *in vitro* n'est pas indicatrice de la différenciation *in vivo*, peu différente d'une lignée à une autre. Ces deux caractères, croissance et différenciation, ne semblent pas utiles à la recherche du mécanisme de la malignité *in vivo*. Le manque de corrélation reflète les différences de comportement cellulaires entre l'environnement artificel de la culture et l'environnement physiologique dans l'animal.

Les quatre lignées pauvres en fibronectine (+ ou ++) se trouvent parmi les plus tumorigènes. D'autres équipes (33, 39) ont déjà constaté la liaison entre une tumorigénicité élevée et la formation réduite *in vitro* d'une matrice extracellulaire de fibronectine. Il faut souligner que certaines des lignées, possèdant une matrice de fibronectine bien développée *in vitro*,

sont aussi tumorigènes que celles qui n'ont qu'une matrice peu développée. La perte de la matrice extracellulaire, bien que liée à une tumorigénicité élevée n'est pas nécessaire à ce phénomène. Les cellules tumorales poussent de façon générale avec indépendance d'ancrage (82) et la sélection de cellules par clonage en agar peut conduire à une malignité plus élevée (82). Y a t'il une relation entre cette indépendance d'ancrage et la tumorigénicité élevée de cellules pauvres en fibronectine ? Il est possible que *in vivo* ces cellules aient moins de contacts avec leurs voisines normales et de ce fait soient moins sensibles aux systèmes qui contrôlent leur croissance dans un tissu. Les résultats obtenus *in vitro* ne soutiennent pas cette hypothèse. En effet la densité de saturation est sans rapport avec la quantité de fibronectine exprimée sous forme de matrice extracellulaire. Il faut remarquer qu'il n'y a pas de cellules normales dans nos cultures de cellules tumorales et donc un contrôle de la croissance des cellules tumorales par les cellules normales est exclu *in vitro*.

D'autres facteurs, tels que l'immunogénicité des cellules et leurs susceptibilités aux lymphocytes NK, par exemple, peuvent intervenir pendant la formation d'une tumeur après injection s.c. de cellules tumorales.

Les résultats d'expériences préliminaires conçues pour déterminer, l'immunogénicité et la susceptibilité à l'effet cytotoxique des lymphocytes NK, des cellules tumorales ne mettent pas en évidence un rôle déterminant de ces caractères dans la tumorigénicité (M.F. POUPON et J. POT-DEPRUN communication personnelle). Toutefois, l'intervention de la surveillance immunitaire n'est pas exclue et est certainement importante dans le rejet, par certains animaux des cellules injectées.

La durée de la première phase de croissance *in vivo* était en moyenne plus longue pour les lignées moins tumorigènes, que pour les lignées plus

tumorigènes. La durée de cette phase était aussi liée au nombre de chromosomes des lignées. Celles qui avaient moins de chromosomes avaient leur première phase allongée. Cependant, toutes les lignées avaient une deuxième phase de croissance d'une durée semblable.

La liaison entre la tumorigénicité et la première phase de croissance indique que ces deux paramètres sont soumis, au moins en partie, aux mêmes influences. La surveillance immunitaire de l'hôte joue certainement un rôle malgré l'absence, à l'heure actuelle, de résultats positifs concernant l'immunogénicité et la sensibilité des cellules à l'effet cytotoxique des lymphocytes NK. Le nombre moyen de chromosomes ne semble pas avoir d'influence sur la tumorigénicité, son influence portant uniquement sur la durée de la première phase de croissance. Cette corrélation rappelle les propositions de NOWELL (11). Cet auteur a suggéré qu'une malignité augmentée des cellules serait acquise par la sélection de cellules mutées, mieux adaptées à la croissance maligne. L'augmentation du nombre de chromosomes réflète une déstabilisation croissante du génotype. CIFONE et al., (87) ont montré que les cellules ayant une mutabilité augmentée métastasent davantage. Par ailleurs CIFONE et al., (88) n'ont pas trouvé de liaison entre le nombre moyen de chromosomes et la croissance sous-cutanée des lignées du mélanome B16 ou du fibrosarcome UV-2237. Une augmentation du nombre de chromosomes est souvent associée à l'état malin (11, 89, 90) mais la corrélation démontrée ici semble unique. L'étude des caryotypes d'autres séries de lignées, issues chacune d'une seule tumeur, permettra d'approfondir notre connaissance des altérations génétiques associées à la malignité. Des expériences en cours qui concernent l'effet de l'injection de mélanges de lignées montrent qu'une lignée, ayant une première phase de croissance d'une longue durée, ralentit la première phase d'une autre lignée, qui injectée seule se développe rapidement. Ces

expériences révèlent la complexité du problème et l'importance des interactions entre les cellules tumorales elles mêmes.

La deuxième phase de croissance était plus courte que la première et variait peu d'une lignée à l'autre. Cette similarité est surprenante quand on se souvient que la tumorigénicité, la première phase de croissance et la croissance *in vitro* étaient hétérogènes. Beaucoup de facteurs peuvent intervenir pour limiter la croissance des tumeurs : la vascularisation, les besoins nutritifs des cellules, le système immunitaire de l'hôte etc ... La taille moyenne des tumeurs à l'autopsie était liée à l'invasion métastatique, des lignées qui donnaient des tumeurs de petite taille en moyenne donnaient peu de métastases spontanées. Ce résultat suggère que les cellules tumorales ont gardé un vestige de contrôle de leur propre croissance. L'intervention de ces divers paramètres qui homogéniseraient la croissance tumorale pendant la deuxième phase, suppose que les lignées ont des propriétés homogènes quand par ailleurs elles se sont montrées, malgré leur origine commune, hétérogènes.

Une autre explication pourrait être qui ces lignées se soient diversifiées pendant la croissance tumorale, ce qui les ramèneraient à l'état de la tumeur parentale, dont le comportement résultait de l'interaction des sous populations, représentées, en partie par les treize lignées clonées. NOWELL (11) a proposé que diverses sous populations apparaissent pendant la croissance tumorale. POSTE (92) a démontré que la capacité colonisante de lignées clonées est instable, mais que le fait de mélanger plusieurs clones stabilise cette capacité pendant un grand nombre de passages *in vivo* ou *in vitro*. D'autre part, FIDLER (91) a observé que les caractères mélanique et amélanique de lignées non clonées du mélanome B16 sont stables. Comme les lignées décrites ici sont clonées, elles présentent peut être une instabilité de leurs propriétés de croissance et se rapprocheraient donc pendant le

développement *in vivo* de la lignée parentale pour avoir une vitesse de croissance du même ordre pendant la deuxième phase.

En conclusion, ces lignées ont des caractères malins différents et permettent la recherche de liaisons entre ces caractères et diverses propriétés des cellules. Certaines lignées sont plus métastasiantes que d'autres mais cette étude ne révèle pas l'existence dans la tumeur d'origine d'une sous-population particulière qui serait par elle même responsable de la formation des métastases.

CONCLUSION GENERALE.-

La démonstration de la relation inverse entre les capacités métastatiques spontanées et expérimentales de ces lignées indique que l'extrapolation des résultats obtenus par injection i.v. des cellules, à l'étude des métastases spontanées ne peut se faire qu'avec précaution. Néanmoins ces résultats peuvent nous aider à approcher les mécanismes du phénomène métastatique.

L'utilisation d'un modèle composé de lignées clonées d'une même tumeur a l'avantage d'éviter les comparaisons hasardeuses entre lignées d'origines différentes ou incertaines. Les lignées isolées de différentes tumeurs, même si ces tumeurs sont semblables, ont très souvent subi une évolution différente qui leur donne des caractères particuliers. Ces caractères peuvent masquer les propriétés qui permettent à certaines lignées de métastaser plus que d'autres. Les lignées isolées d'une même tumeur ont l'avantage d'avoir un fond commun, et la variété de leurs capacités malignes dépend essentiellement de caractères spécifiquement liés à cette malignité. Cependant un tel modèle présente certaines restrictions. Le clonage des lignées impose une sélection de cellules qui sont capables de former des colonies en culture et qui sont adaptées à la croissance *in vitro*. De plus les lignées clonées sont privées des interactions avec les autres sous populations de la tumeur d'origine.

Le processus métastatique est complexe et un grand nombre de facteurs interviennent dans son déroulement. Ce travail ne traite que d'un petit nombre de ces facteurs. Les propriétés d'une cellule tumorale ou de l'hôte qui favorisent ou inhibent la formation de métastases sont multiples.

.../...

De l'ensemble de ces propriétés il se peut que peu ou aucune ne soit à elle seule nécessaire à la formation d'une métastase. Le chercheur essayant de résoudre le problème se retrouve souvent avec des résultats sous forme de tendances d'une signification statistique limitée. Une propriété aide une cellule à métastaser mais si elle manque cette cellule métastase quand même. Donc on peut considérer que la cellule a "le choix" dans un éventail de moyens et n'est obligée d'en utiliser qu'un certain nombre, dont aucun ne détermine seul le destin de la cellule métastasiante.

BIBLIOGRAPHIE

1. SUGARBAKER, E. V., KETCHAM, A. S.,
Mechanism and prevention of cancer dissemination, Semin. Oncol., 4 : 19-32, (1977).

2. FRANKS, L. M., (1973)
In "Chemotherapy of cancer dissemination and metastasis" (S. Garrattini and G. Franchi, eds.) pp 71-78 Raven Press New-York.

3. HEPPNER, G. M., DEXTER, D. L., DENUCCI, T., MILLER, F. R. and CALABRESI, P.,
Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell sub populations of a single mammary tumor.Cancer Res., 38 : 3758-3763, (1978).

4. HAGER, J. C., RUSSO, J. CERIANI, R. L., PETERSON, J. A. FLIGIEL, G., JOLLY, G. and HEPPNER, G. H.,
Epithelial characteristics of a heterogeneous strain BALB/cf C3H mouse mammary tumor. Cancer Res., 41 : 1720-1730 (1981).

5. GRDINA, D. J., HITTELMAN, W. N., WHITE, R. A. and MEISTRICH, M. L.
Relevance of density, size and DNA content of tumor cells to the colony assay. Br. J. Cancer 36 : 659-669 (1977).

.../...

6. CIFONE, M. A., KRIPKE, M. L. and FIDLER, I. J.,
Growth rate and chromosome number of cell lines with different metastatic potental. J. Supramelec. Str., 11 : 467-476, (1979).

7. BRATTAIN, M. G., FINE, W. D., MAHNEZ KHALED, F., THOMPSON, J. and BRATTAIN, D. F.
Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. Cancer Res. 41 : 1751-1756, (1981).

8. TSURUO, T. and FIDLER, I. J.,
Differnces in drug sensitivity among tumor cells from parental tumor, selected variants and spontaneous metastases. Cancer Res. 41 : 3058-3064, (1981).

9. PREHN, R. T.,
Analysis of antigenic heterogeneity with individual 3-methyl-cholanthrene induced mouse sarcomas. J. Natl. Cancer Inst., 45 : 1039-1045, (1970).

10. BANIYASH, M., NETANEL, T. and WITZ, I. P.,
Differences in cell density associated with differences in lung colonizing ability of B16 melanoma cells. Cancer Res., 41 : 433-437, (1981).

11. NOWELL, P. C.,
The clonal evolution of tumor cell populations, Science, 194 : 23 28, (1976).

12. FIDLER, I. J.,
Selection of successive tumor lines for metastasis, Nature New Biology 242 : 148-149, (1973).

.../...

13. FIDLER, I.J. and KRIPKE, M.L.,
Metastasis résults from preexisting variant cells within a malignant tumor. Science, 197 : 893-895, (1977).

14. KRIPKE, M.L., GRUYS, E. and FIDLER, I.J.,
Metastatic heterogeneity of cells from an ultraviolet light-induced murine fibrosarcoma of recent origin. Cancer Res., 38 : 2962-2967, (1978).

15. SUZUKI, N., FRAPART, M., GRDINA, D.J., MEISTRICH, M.L. and WITHERS, R.M.,
Cell cycle dependency of metastatic lung colony formation. Cancer Res., 37 : 3690-3693, (1977).

16. POSTE, G., DOLL, J., HART, I.R. and FIDLER, I.J.,
In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. Cancer Res., 40 : 1636-1644, (1980).

17. HART, I.R.,
The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. Am. J. Pathol., 97 : 587-600, (1969).

18. FIDLER, I.J.,
Immune stimulation-inhibition of experimental cancer metastasis. Cancer Res., 34 : 491-498, (1974).

19. FIDLER, I.J.,
Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. Cancer Res., 35 : 218-224, (1975).

.../...

20. FIDLER, I.J., GERSTEN, D.M. and BUDMEN, M.B.,
Characterization *in vivo* and *in vitro* of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity.
Cancer Res., 36 : 3160-3165, (1976).

21. NICOLSON, G.L. and WINKELHAKE, J.L.,
Organ specificity of blood-borne tumor metastasis determined by cell adhesion ? Nature, 255 : 230-232, (1975).

22. NICOLSON, G.L., BRUNSON, K.W. and FIDLER, I.J.,
Specificity of arrest, survival and growth of selected metastatic variant cell lines. Cancer Res., 38 : 4105-4111, (1978).

23. BRUNSON, K.W., BEATTIE, G. and NICOLSON, G.L.,
Selection and altered properties of brain-colonizing metastatic melanoma. Nature, 272 : 543-545, (1978).

24. WARREN, B.A. and VALES, O.,
The adhesion of thromboplastic tumor emboli to vessel walls *in vivo*.
Br. J. Exp. Path., 52 : 301-313, (1972).

25. HILGARD, P.,
The role of blood platelets in experimental metastases.
Br. J. Cancer, 28 : 429-435, (1973).

26. GASIC, G.J., BOETTIGER, D., CATALFAMO, J.L., GASIC, T.B., and STEWART, G.J.,
Aggregation of platelets and cell membrane vesiculation by rat cells transformed *in vitro* by Rous sarcoma virus.
Cancer Res., 38 : 2950-2955, (1978).

.../...

27. POGGI, A., POLENTARUTTI, N., DONATI, M.G., DE GAETANO, G. and GARATTINI, S., Blood coagulation changes in mice bearing Lewis lung carcinoma, a metastasising tumor. Cancer Res., 37 : 272-277, (1977).

28. HARA, Y., STEINER, M. and BALDINI, M.G., Platelets as a source of growth-promoting factor for tumor cells. Cancer Res., 40 : 1212-1216, (1980).

29. MAAT, B. and HILGARD, P., Anticoagulants and experimental metastases-evaluation of antimetastatic effects in different model systems. J. Cancer Res. Oncol., 101 : 275-283, (1981).

30. FITZPATRICK, F.A. and STRONGFELLOW, D.A., Prostaglandin D2 formation by malignant melanoma cells correlates inversely with cellular metastatic potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 1765-1769, (1979).

31. MURRAY, J.C., LIOTTA, L., RENNARD, S.I. and MARTIN, G.R., Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells *in vitro*. Cancer Res., 40 : 347-351, (1980).

32. Mc INTYRE, L.J., KLEINMAN, H.K., MARTIN, G.R. and YOUNG, S.K., Attachment of human pancreatic tumor cell lines to collagen *in vitro*. Cancer Res., 41 : 3296-3299, (1981).

33. CHEN, L.B., GALLIMORE, P.M. and Mc DOUGALL, J.K., Correlation between tumor induction and the large external transformation sensitive protein on the cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 : 3570-3574, (1976).

.../...

34. CHEN, L.B., BURRIDGE, K., MURRAY, M., WALSH, M.L., COPPLE, C.D., BUSHNELL, A., Mc DOUGALL, J.K. and GALLIMORE, P.H.,
Modulation of cell surface glycocalyx : studies on large, external, transformation-sensitive protein.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 312 : 366-381, (1978).

35. NERI, A., RUOSLATHI, E. and NICOLSON, G.L.,
Relationship of fibronectin to the metastatic behaviour of rat mammary adenocarcinoma cell lines and clones.
J. Supramolec. Struct., 3 : 181, (1979).

36. VAHERI, A. and MOSHER, D.F.,
High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. Biochem. Biophys. Acta, 516 : 1-25, (1978).

37. YAMADA, K.M. and OLDEN, K.,
Fibronectins - adhesive glycoproteins of cell surface and blood.
Nature, 275 : 179-184, (1978).

38. PEARLSTEIN, E., GOLD, L.I. and GARCIA-PARDO, A.,
Fibronectin : A review of its structure and biological activity.
Mol. Cell. Biochem., 29 : 103-128, (1980).

39. SPICER, D. and BRANTON, P.E.,
Reduction of cell surface fibronectin (LETS protein) correlated with tumorigenicity of hamster fibroblasts transformed by Herpes simple virus type 2. Intervirology, 13 : 58-64, (1980).

.../...

40. HEDMAN, K., VAHERI, A. and WARTIOVAARA, J.,
External fibronectin of cultured human fibroblasts is predominantly a matrix protein. J. Cell Biol., 76 : 748-760, (1978).

41. STENMAN, S. and VAHERI, A.,
Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues.
J. Exp. Med., 147 : 1054-1064, (1978).

42. LINDER, E., VAHERI, A., RUOSLATHI, E. and WARTIOWAARA, J.,
Distribution of fibroblasts surface antigen in the developing chick embryo, J. Exp. Med., 142 : 41-49, (1975).

43. BLUMENSTOCK, F.A., SABA, T.M. and WEBER, P.,
Purification of Alpha-2-Opsonic protein from human serum and its measurement by immunoassay.
J. Reticuloendothel. Soc., 23 : 119-134, (1978).

44. BLUMENSTOCK, F., SABA, T.M., WEBER, P. and CHO, E.,
Purification and biochemical characterization of a macrophage stimulating Alpha-2-Globulin Opsonic protein.
J. Reticuloendothel. Soc., 19 : 157-172, (1976).

45. ANTIKATZIDES, T.G. and SABA, T.M.,
Kupffer cell clearance function following intravenous tumor cell challenge. J. Reticuloendothel. Soc., 22 : 1-12, (1977).

46. SABA, T.M. and ANTIKATZIDES, T.G.,
Decreased resistance to intravenous tumour-cell challenge during reticuloendothelial depression following surgery.
Br. J. Cancer, 34 : 381-389, (1976).

.../...

47. SANTORO, S.A. and CUNNINGHAM, L.W.,

Fibronectin and the multiple interaction model for platelet-collagen adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 2644-2648, (1979).

48. GRINNEL, F.,

Fibroblast cell-substratum interactions : Role of cold insoluble globulin (plasma Fibronectin).

Experientia, 36 : 505-507, (1980).

49. CHIQUET, M., EPPENBERGER, H.M. and TURNER, D.C.,

Muscle morphogenesis : evidence for an organizing function of exogenous fibronectin. Develop. Biol., 88 : 220-235, (1981).

50. HEASMAN, J., HYNES, R.O., SWAN, A.P., THOMAS, V. and WYLIE, C.C.,

Primordial germ cells of *Xenopus* embryos : the role of fibronectin in their adhesion during migration.

Cell, 27 : 437-447, (1981).

51. PISANO, J.C., JACKSON, J.P., DILUZIO, N.R. and ICHINOSE, H.,

Dimensions of humoral recognition factor depletion in carcinomatous patients. Cancer Res., 32 : 11-15, (1972).

52. HILDEBRAND, H.F., and BISERTE, G.,

Ultrastructural investigation of Ni_3S_2 - induced rhabdomyosarcoma in Wistar rat. Cancer, 42 : 528-554, (1978).

53. BASRUR, P.K. and GILMAN, J.P.W.,

Behavior of two cell strains derived from rat rhabdomyosarcomas.

J. Natl. Cancer Inst., 30 : 163-201, (1963).

.../...

54. JUDDE, J. G.,

Etude d'un modele de carcinogénèse par le nickel chez le rat D.E.A. (1980) Universite de Paris VII.

55. FIDLER, I. J., GERSTEN, D. M. and HART,

The biology of cancer invasion and metastasis, Adv. Cancer Res. 28 : 149-250, (1978).

56. POSTE, G. and FIDLER, I. J.,

The pathegenesis of cancer metastasis, Nature, 283 : 139-146, (1980).

57. CLEN, L. B.,

Alteration in cell surface LETS protein during myogenesis, Cell, 10 : 393-400, (1977).

58. PRIVES, J., SILMAN, I. and AMSTERDAM, A.,

Appearance and disappearance of acetylcholine receptor during differentiation of chick skeletal muscle *in vitro*, Cell, 7 : 543-550, (1976).

59. CHEN, T. R., *in situ* detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain, Exp. Cell Res., 104 : 255-262, (1977).

60. ENGVALL, E. and RUOSLATHI, E.,

Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen, Int. J. Cancer, 20 : 1-5, (1977).

61. STACKPOLE, C. W.,

Distinct lung-colonizing and lung-metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma, Nature, 289 : 798-800, (1981).

62. DILUZIO, N. r., MC NAMEE, R., MILLER, E. F. and PISANO, J. C.

Macrophage recognition factor depletion after administration of particulate agents and leukemic cells. J. Reticuloendothel. Soc. 12 : 314-323, (1972).

63. YAMADA, K. M., OLSEN, K. and PASTAN, I.

Transformation-sensitive cell surface protein : Isolation, characterization, and role in cellular morphology and adhesion., Ann. N. Y. Acad. Sci. 312 : 256-277, (1978).

64. PEARLSTEIN, E. and GOLD, L. I.,

High molecular weight glycoprotein as a mediator of cellular adhesion, Ann. N. Y. Acad. Sci. 312 : 278-292, (1978).

65. PEARLSTEIN, E.,

Substrate activation of cell adhesion factor A5 a prerequisite for cell attachment, Int. J. Cancer, 22 : 32-35, (1978).

66. FIDLER, I. J.,

The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastases, Eur. J. Cancer, 9 : 223-227, (1973).

67. FIDLER, I. J. and LIEBER, S.,

Quantitative analysis of the mechanism of glucocorticoid enhancement of experimental metastasis, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 4 : 607-613, (1972).

68. NICOLSON, G.L., IRIMURA, I, CONZALEZ, R. and RUOSLATHI, E.,
The role of fibronectin in adhesion of metastatic melanoma cells to endothelial cells and their basal lamina.
Exp. Cell Res., 135 : 461-465, (1981).

69. PENA, S.D.J. and HUGHES, R.C.,
Fibronectin-plasma membrane interactions in the adhesion and spreading of hamster fibroblasts.
Nature, 276 : 80-83, (1978).

70. NERI, A., RUOSLATHI, E. and NICOLSON, G.L.,
Distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat mammary adenocarcinoma growing *in vitro* and *in vivo* at primary and metastatic sites. Cancer Res., 41 : 5082-5095, (1981).

71. SMITH, M.S., RIGGS, J.L. and MOSESSON, M.W.,
Production of fibronectin by human epithelial cells in culture.
Cancer Res., 39 : 4138-4144, (1979).

72. CHEN, L.B., SUMMERHAYES, I., HSIEH, L. and GALLIMORE, P.M.,
Possible role of fibronection in malignancy.
J. Supramolec. Struct., 12 : 139-150, (1979).

73. HART, I.R.,
The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. Am. J. Pathol., 97 : 587-600, (1979).

74. VARANI, J., LOVETT, E.J., ELGEBALY, S., LUNDY, J. and WARD, P.A.,
In vitro and *in vivo* adherence of tumor cell variants correlated with tumor formation. Am. J. Pathol., 101 : 345-352, (1980).

.../...

75. EVERS, J.L., PATEL, J., MADEJA, J.M., SCHNEIDER, S.L., HOBIKA, G.M., CAMIOLO, S.M. and MARKUS, G.,

Plasminogen activator activity and composition in human breast cancer. Cancer Res., 42 : 219-226, (1982).

76. DISTEFANO, J.F., BECK, G., LANE, B. and ZUCKER, S.,

Role of tumor cell membrane-bound serine proteases in tumor-induced target cytolysis. Cancer Res., 47 : 207-218, (1982).

77. JONES, P.A., LAUG, W.E., GARDNER, A., NYE, C.A., FINK, L.M. and BENEDICT, W.F.,

In vitro correlates of transformation in C3H/10T1/2 clone 8 mouse cells. Cancer Res., 36 : 2863-2867, (1976).

78. WANG, B.S., Mc LOUGHLIN, G.A., RICHIE, J.P. and MANNICK, J.A.,

Correlation of the production of plasminogen activator with tumor metastasis in B16 mouse melanoma cell lines.
Cancer Res., 40 : 288-292, (1980).

79. BROWN, J.M.,

A study of the mechanism by which anticoagulation with warfarin inhibits blood-born metastases. Cancer Res., 33 : 1217-1224, (1973).

80. DONATI, M.B., MUSSONI, L., POGGI, A., DEGAETANO, G., and GARATTINI, S.,

Growth and metastasis of the Lewis lung carcinoma in mice defibrinated with batroxobin. Eur. J. Cancer, 14 : 343-347, (1978).

81. GROSSI, C.E., AGOSTINO, D. and CLIFFTON, E.E.,

The effect of human fibrinolysin on pulmonary metastases of Walker 256 carcinoma. Cancer Res., 20 : 605-608, (1960).

82. CIFONE, M.A., and FIDLER, I.J.,

Correlation of patterns of anchorage-independent growth with *in vivo* behaviour of cells from a murine fibrosarcoma.

Proc. Natl. Acad. Sci., 77 : 1039-1043, (1980).

83. ASCH, B.B., KAMAT, and BURSTEIN, N.A.,

Interactions of normal dysplastic, and malignant mammary epithelial cells with fibronectin *in vivo* and *in vitro*.

Cancer Res., 41 : 2115-2125, (1981).

84. STAMPFER, M.R., VLODAVSKY, I., SMITH, M.S., FORD, R., BECKER, F.F., and RIGGS, J.,

Fibronectin production by human mammary cells.

J. Natl. Cancer Inst., 67 : 253-261, (1981).

85. SANDMEYER, S., SMITH, R., KIEHN, and BORNSTEIN, P.,

Correlation of collagen synthesis and procollagen messenger RNA levels with transformation in rat embryo fibroblasts.

Cancer Res., 41 : 830-838, (1981).

86. HYNES, R.O.,

Cell surface proteins and malignant transformation.

Biochem. Biophys. Acta, 458 : 73-107, (1976).

87. CIFONE, M.A., and FIDLER, I.J.,

Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms.

Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 78 : 6949-6952, (1981).

.../...

88. CIFONE, M.A., KRIPKE, M.L., and FIDLER, I.J.,
Growth rate and chromosome number of tumor cell lines with different metastatic potential.
J. Supramolec. Struct., 11 : 467-476, (1979).

89. DIPAOLO, J.A.,
Karyological instability of neoplastic somatic cells.
In vitro, 11 : 89-96, (1975).

90. CELLIER, K.M., KIRKLAND, J.A. and STANLEY, M.A.,
Statistical analysis of cytogenetic date in cervical neoplasia.
J. Natl. Cancer Inst., 44 : 1221-1230, (1970).

91. FIDLER, I.J. and HART, I.R.,
Biological and experimental consequences of the zonal composition of solid tumors.
Cancer Res., 41 : 3266-3267, (1981).

92. POSTE, G., DOLL, J. and FIDLER, I.J.,
Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 6226-6230, (1981).

93. LIOTTA, L.A., TRYGGVASON, GARBISA, S., HART, I., FOLTZ, C.M. and SHAFIE, S.,
Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.
Nature, 284 : 67-68, (1980).

94. HILDEBRAND, H.F., and BISERTE, G.,
Ultrastructural investigation of Ni_3S_2 induced rhabdomyosarcoma in Wistar rat. Cancer, 42 : 528-554, (1978).

Heterogeneity of the growth and metastatic behaviour of cloned cell lines derived from a primary rhabdomyosarcoma[1].

Fergus L. Sweeney[2], Jacques Pot-Deprun, Marie-France Poupon, and I. Chouroulinkov[3].

Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, B.P. N°8, 94802 - Villejuif Cedex, France

Running title : Growth and metastasis of cloned lines of a rhabdomyosarcoma.

[1]This work was supported by grant n° ATP 77-79-109, Contract INSERM n° 002.

[2] Supported by a grant from the Directorate-General for Science Research and Development of the Commission of the European Communities.

[3] To whom reprint requests should be adressed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Renée Grassot and Annette Duverger for their excellent technical assistance, Marie-Thérèse Maunoury for the statistical analysis and Laetitia Guglielmi, Françoise Maugain and Patricia Blanchin for their secretarial assistance.

ABSTRACT

In order to study the heterogeneity of the metastatic and tumorigenic behaviors of malignant neoplasms we have isolated a series of cloned cell lines from a primary nickel induced rat rhabdomyosarcoma. The growth characteristics *in vitro* and *in vivo* and metastatic capacity following s.c. or i.v. injection of cells were compared to those of the parental cell line. Differences between the cloned cell lines themselves and between the clones and the parental cells were found in the number of metastases provoked by both i.v. and s.c. injections, in the number of cells required to induced s.c. tumors and in the growth rate of those tumors. *In vitro* the doubling times and saturation densities of the different cell lines varied greatly. A direct correlation was observed between the TD50[4] and the initial tumor growth phase. We found that there was a tendency for lines which were highly metastatic after s.c. injection to have a low metastatic capacity after i.v. injection and inversely. The two types of metastasis (spontaneous and experimental) appear therefore to depend on different characteristics of the cells used.

Abbreviations used ; [4] TD50 - Tumoral Dose 50 % ; [5] PBS - Phosphate Buffered Saline.

INTRODUCTION

The heterogeneous nature of the cellular populations of malignant neoplasms is now recognized for a number of biological characteristics (7, 19, 21). Subpopulations of neoplasms with different tumorigenic and metastatic behaviors have been identified (9, 11, 12). Variations are also found in antigenic properties, sensitivity to cytotoxic agents, cell density and chromosome number (1, 2, 5, 23, 25). Such studies have two aspects of basic importance. Firstly, from a therapeutic point of view it is important to recognize that certain subpopulations of a tumor are more responsible for invasion and metastasis and may present a different sensitivity to therapy than many of the cells making up the tumor mass. Secondly, the possession of a series of different subpopulations of a tumor allows the search for a correlation between a particular biological characteristic and a graded series of invasive and metastatic behaviors.

In this study we have used a rhabdomyosarcoma induced by the intra-muscular injection of nickel in the thigh of a male WAG rat. The primary tumor was put directly into cell culture without any intervening passages *in vivo*. The cultured parental tumor cells were cloned *in vitro* in liquid and semi-solid media thus providing a series of cell lines for study.

The purpose of the work described in this article was to investigate the possible heterogeneity present in this tumor. We also investigated the relationship between spontaneous and experimental metastases, because the widespread use of i.v. injected cells as a metastatic model requires the definition of their relevance to spontaneous metastatic events.

MATERIALS AND METHODS

Animals. For all *in vivo* studies 8-10 week old male WAG rats from the SPF breeding house (I.R.S.C. - Villejuif) were used.

Parental cells and cloned cell lines. The rhabdomyosarcoma (designated 9-4) was induced in this laboratory by an intramuscular injection of 20 mg Ni in the thigh of a male WAG rat. The tumor was removed when it had attained a diameter of 20 mm at which stage metastases were observed in the lungs and lymphatic ganglia. The tumor was sliced in half and one half was used for cell culture. The tissue was minced finely in PBS [5] (Phosphate Buffered Saline containing (g/liter) : NaCl, 8 ; KCl, 0.2 ; $CaCl_2$, 0.1 ; $MgCl_2$, 0.1 ; Na_2HPO_4, 1.1 ; KH_2PO_4, 0.2; pH 7.4) and then dissociated in 0.25 % Trypsin. Complete medium was added and the mixture was centrifuged, resuspended and plated. The parental cells (9-4/0), thus obtained, were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco Laboratories, Grand Island, New York) supplemented with 10 % heat inactivated fetal calf serum (Flow Laboratories, United Kingdom) 1 % of an antibiotic solution streptomycin-penicillin 5×10^3 U/ml was added (Gibco Europe, Glasgow, Scotland). This standard growth

medium was used for all experiments. Cultures were grown at 37° in a humidified atmosphere containing 10 % CO_2.

The cell lines were isolated using two cloning methods. The F 9-4 lines were isolated in liquid medium and the J 9-4 lines in semi-solid medium. In liquid medium a 1 cell/ml suspension was distributed at 0.25 ml/well in a Microtest culture plate (Falcon, Becton-Dickinson, California). The wells were observed microscopically and those where two or more colonies appeared to be forming were eliminated. The selected colonies were replated for one passage in 60 mm plates and then recloned, as above, to ensure their monocellular origin. In semi-solid medium the cells were cloned at 100 cells/plate following a modification of the technique of Montagnier (15). The cells were plated in standard growth medium with 0.5 % agarose. Isolated colonies were removed from the gel and replated in liquid medium. The cell lines were tested for and found free of Mycoplasma by staining with Hoechst 33258 (3). The parental population and the cell lines are stored in liquid nitrogen in complete medium with 10 % glycerine.

Subcutaneous and intravenous injections. Cells were grown in culture to subconfluence and dispersed using 0.25 % Trypsin. Medium containing 10 % fetal calf serum was added to inactivate the trypsin, the suspensions were centrifuged and resuspended in PBS. Only suspensions showing more than 90 % viability by trypan blue exclusion were used.

The suspensions were diluted to provide the required number of cells to be injected in 0.1 ml PBS. For subcutaneous injections 10^3, 10^4, 10^5 and 10^6 cells were injected into 5 animals for each cell concentration. The injection site was on the right flank, at one third of the distance from the hind to the foreleg. The animals were examined once a week thereafter. Following the appearance of palpable tumors these were measured (the average of two diameters) once a week until death. The appearance of palpable metastases at the inguinal and axillary lymph nodes was noted during tumor development. Moribund animals were sacrified and examined for metastatic invasion. For intravenous injections 10^5 cells in 0.1 ml PBS were injected in the tail vein using 10 animals per group. The cells injected i.v. were maintained as single cell suspensions by placing the containers of freshly trypsinized and dispersed cells on crushed ice. This procedure prevented the formation of aggregates and was verified by microscopic observation. The rats were sacrificed 10 weeks later and the number of tumor colonies apparent at the lung surface was counted macroscopically. Any other tumor growths were noted. The presence of suspected metastases was confirmed by histological examination.

In vitro growth curves. Cells were plated at 50,000 cells/60 mm plate in standard growth medium. Duplicate plates were trypsinized and the cells counted using a Coulter counter (Coultronics France) every 24 hrs.

Calculation of TD50 and statistical analysis of metastases. The TD50s were calculated by probit analysis of the

number of positive animals per cell injection dose. The relationships between lung and lumbaraortic ganglia spontaneous metastases and experimental lung metastases were determined using Yates X^2 test. All other tests were performed using the student's t test.

RESULTS

Tumorigenic and metastatic behavior and *in vitro* growth of the cultured parental tumor cells 9-4/0. The subcutaneous injection of the cultured parental tumor cells 9-4/0 induced tumors at all doses used. The number of positive animals per group increased with the number of cells injected. From these results we can calculate the number of cells required to induce tumors in 50 % of animals injected (TD50) as 3,100 for the parental culture. The growth curves (Chart 1A) show the mean diameter of the tumors appearing for each injection dose. The negative animals were not included in the calculation of these means. Observation of the tumor growth rate led us to study two phases of the tumor progression (Chart 1B). The first phase includes the latency of appearance of a palpable tumor and the growth to a diameter of 15 mm. The second phase represents the growth of the established tumors from 15-30 mm in diameter.

The first phase was dependent on the number of cells injected and was longer for the smaller cell doses. The second phase was not dependent on the number of cells injected and was generally shorter than the first phase.

Metastases appeared at the inguinal and axillary lymph nodes, the abdominal and mediastinal ganglia and in the lungs (Table 2). These metastatic sites are the same as those found for the primary nickel induced tumor.

The metastases at the inguinal and axillary lymph nodes were detected by palpation during tumor development. They appeared, in 13/17 animals and when the tumors had reached a diameter of $\simeq$ 30 mm, whatever the number of cells injected. The axillary lymph node was invaded at a later stage. The nodes contralateral to the tumor were rarely invaded.

The central metastases were observed at autopsy which was performed when the tumors had reached an average diameter of 38 mm (varying from 25-50 mm). The time of autopsy depended on the clinical state of each animal. Metastases were observed in the lungs of 12/15 animals autopsied. The degree of invasion of the lungs varied. Lung metastases numbered from 1-25 (mean 9 ± 2.1) and measured from $\simeq$ 1 mm to 8 mm. Invasion of extrapulmonary mediastinal tissue was found in 12/15 animals but was independent of the degree of invasion of the lungs. In 6/15 animals the lumbaraortic ganglia were invaded by metastases.

The lung colonizing capacity (Table 3), evaluated as the mean number of lung colonies counted in 18 animals, 10 weeks after i.v. injection of 10^5 cells, was 7 (range 0-40).

In vitro the parental cells had a doubling time of 23 hrs and a saturation density of 2.3×10^5 cells/sq cm (Table 1).

Tumor growth curves and the tumor inducing dose of the cloned cell lines. Chart 2 shows the growth curves of two of the lines following s.c. injection (F9-4/8 and F9-4/18). The two phases of growth of these two cell lines are illustrated in Chart 3. The duration the first phase of tumor growth varied greatly between the cell lines. The rate of tumor growth was similar for the second phase from 15-30 mm. These results are given in numerical form in Table 1. Regressions were calculated for the duration of each phase using the values for the injected cell doses as illustrated in Chart 3. We deduced from these regressions the duration of the phases at a theoretical dose of 5×10^4 injected cells. A heterogeneity between the cell lines was seen in the first phase which varied from 28 to 93 days, the second phase however was similar for all cell lines.

The analysis of the results obtained for the TD50s of the clones showed that they can be divided into three groups low $<$ 1,000, intermediate $>$ 1,000 and $<$ 10,000, and high $>$ 10,000 (Table 1). A correlation exists between the TD50 and the length of the first phase of tumor growth. The mean length of the first growth phase being different ($p < 0.05$) between the low and high TD50 groups, the intermediate group was not significantly different from either the low or the high group (Student's t test).

Metastatic behavior of tumours induced by s.c. injection of the cloned cell lines. The metastatic capacities of the lines are given in Table 2 which gives the percentage of animals showing each type of metastasis and the mean number of

pulmonary metastases in those animals. All the clones metastasized to the same sites as the parental cells. Metastases at the inguinal and axillary ganglia were detected by palpation and occured when the tumors had reached a diameter of ≃ 30 mm. This observation was the same for all the clones and for the parental cells. At autopsy the percentage of animals with inguinal metastases was 81-100 % for all the clones. The proportion of animals with axillary metastases was 70 % overall but varied from one clone to another (38-100 %). The lymph ganglia contralateral to the tumor were less frequently invaded, inguinal metastases being found in 0-53 % of animals and axillary metastases in 0-21 % of animals. Invasion of the lumbaraortic ganglia ranged from 10 % of animals for clone J 9-4/2 to 100 % for clone F 9-4/9. The sizes of the metastases in the inguinal, axillary and lumbaraortic ganglia did not reveal any differences either among the clones or between the clones and the parental line. The mean sizes of the ganglionary metastases were, inguinal 20 mm, axillary 14 mm and lumbaraortic 15 mm.

All the cloned lines gave rise to pulmonary metastases in 80-100 % of animals. The mean number of pulmonary metastases counted at the lung surface varied between the clones. The clones J 9-4/11 and F 9-4/8, low metastasizing lines gave rise to 9 $\pm$ 2.3 and 10 $\pm$ 2.6 metastases respectively. The clones F 9-4/6 and F 9-4/9, high metastasizing lines gave rise to 35 $\pm$ 4.3 and 28 $\pm$ 5.9 metastases respectively. In general the cloned cell lines showed a greater capacity to metastasize to the lungs than did the parental cells.

Extrapulmonary mediastinal metastases occured in 0-88 % of animals.

No consistent difference was observed between the behavior of clones isolated in semi-solid medium and those isolated in liquid medium.

Lung colonizing capacity of the cloned cell lines following i.v. injection. The lung colonizing capacity of the cloned cell lines revealed two groups (Table 3). One group had a low colonizing capacity ranging from 1 colony/animal for F 9-4/8 to 8 colonies for J 9-4/7 similar to the parental line and the second group had a high colonizing capacity ranging from 14 colonies/animal for J 9-4/11 to 26 colonies/animal for J 9-4/3. Extrapulmonary colonies occured in all of the high colonizing lines. The extrapulmonary colonies occured mainly in the mediastinum but also in the peritoneal cavity. The clones F 9-4/20 and F 9-4/6 showed a particularly strong tendency to colonize elsewhere than in the lungs. As for the spontaneous metastatic capacity, no difference in behavior was detected between the clones isolated in semi-solid medium and those isolated in liquid medium.

In vitro growth curves. The doubling time and saturation density of each clone are given in Table 1. The *in vitro* growth of the clones varied greatly. Three of the clones had distinctly longer doubling times (26-30 hr) than the parental line, eleven were similar (19-22 hr) and eight had shorter doubling times (13-18 hr). The saturation densities at confluence also varied considerably ranging from 0.3×10^5 cells/sq cm (J 9-4/4) to 3.8×10^5 cells/sq cm (F 9-4/13).

DISCUSSION

The heterogenous character of tumors is being given increasing attention due to the important role which may be played by certain subpopulations in the metastatic process. Cloned cell lines such as those described in this article provide a useful research tool for the investigation of tumor biology and for the trial of new or established anticancer agents (14, 25). The experiments described in this article represent the basic growth and metastatic properties of the cloned cell lines of the primary rhabdomyosarcoma.

Differences were found in the number of cells required to induce tumors (TD50) by s.c. injection and in the length of time required for a tumor to appear and grow to 15 mm in diameter. These two factors show a direct relationship, the greater the number of cells required to induce a tumor the longer the time required for the tumor growth to 15 mm for a given injection dose ($p < 0.05$). The TD50 and the duration of the first growth phase may depend on the type and extent of the interactions between the tumor cells and the host's defence systems. Preliminary results of experiments designed to test the immunogenicity of the cell lines do not indicate any relationship between this factor and either the TD50 or the length of the first growth phase. However, once the tumors reached a diameter of 15 mm, the subsequent growth rate was similar for all clones and for the parental cells. It is worth underlining the homogeneity of the second growth phase particularly since the first growth phase, the TD50 and the *in vitro* growth characteristics showed such marked heterogeneity. The

homogeneity of the second phase may be due to factors such as necrosis or vascularization but since these may depend on the nutritive requirements and ability to stimulate angiogenesis of the different lines the homogeneity is surprising. Or does this indicate, on the contrary a return to the parental state - a mixture of subpopulations ? A genetic instability of tumor cells has been proposed by Nowell (19) to explain the appearance of different subpopulations. The question of whether or not a cloned cell line is stable has been raised by Poste (20) in relation to experimental metastatic capacity which he found to be unstable. Fidler (8) observed that the melanotic or amelanotic character of *in vivo* passaged, uncloned, B16 melanoma tissue was stable. In Poste's experiments the mixing of several cloned lines stabilized the experimental metastatic capacity over a large number of *in vitro* or *in vivo* s.c. passages. Since our cell lines are cloned they may demonstrate an instability of their growth caracteristics. The similarity of the tumor growth rate of the cell lines in the second phase, may be due to the reappearance of a heterogeneous population having a growth rate like that of the parental line.

The metastatic sites invaded by the cloned cell lines following s.c. injection of cells were the same as those invaded by the parental cells and the primary nickel induced tumor. The metastatic properties of the cloned cell lines showed differences in the degree of metastasis found. These differences were observed in the percentage of animals per group with lymph node metastases and in the number of metastases found at the lung surface. The clones showing a higher degree of metastasis tended to do so

to all the metastatic sites. This relationship was particularly marked between the number of lung metastases and the percentage of animals with metastases at the lumbaraortic ganglia (Table 4).

The lung colonizing capacity following i.v. injection of cells revealed the existence of two groups, a low colonizing group (12 cloned lines) and a high colonizing group (9 cloned lines). The extrapulmonary colonization by these clones, which occured mainly in the mediastinum was proportional to the lung colonizing activity. This was seen, in as much as, the clones showing no extrapulmonary colonies were in the low lung colonizing group and the clones showing a particularly high extrapulmonary activity were in the high lung colonizing group.

The clones having a low lung colonizing capacity showed a higher spontaneous metastatic potential than those with a high lung colonizing capacity. The parental cells however are in the low group for both spontaneous and experimental metastases. This inverse relationship we have found between the experimental and spontaneous metastatic capacity of our cloned cell lines is important and shows that extrapolation of results obtained with experimental metastases to the spontaneous metastatic process must be done with great caution. This relationship was seen particularly in the case of lung and lumbaraotic spontaneous metastases (Table 4).

Stackpole (24) observed a similar tendency using clone of the B16 melanoma. However Kripke (12) using clones of the 2237 fibrosarcoma and Fidler (6) using the B16 melanoma found a direct

relationship between experimental and spontaneous metastatic potential, the clones having either a high potential in both cases or a low potential in both cases. The differences may be due to the different types of tumors used. These differences may also be due in part to the injection protocols used for the study of spontaneous metastases. In our experiments the injections were made s.c. in the flank, an area which is relatively unvascularized. As demonstrated by Stackpole (24) the injection site chosen, which may be more or less well vascularized, may result in the unintentional introduction into the circulation of cells intended to result in local tumor growth and spontaneous metastases. These cells introduced into the vascular system might give rise to experimental lung colonies, particularly if they were from a high colonizing line, which would then be counted as spontaneous metastases thus increasing the spontaneous metastatic capacity attributed to the cell line being studied. Stackpole found that s.c. injection in the flank gave rise to few such anomalous metastases. It is notable that in our system the inverse relationship was seen not only for spontaneous lung metastases (probably blood borne) but also for spontaneous lumbaraortic ganglia metastases which are probably passed through the lymphatic system. There appears to be a common requirement of cells for metastasis in both liquid conducting systems. Although we must be careful to distinguish between experimental metastasis and spontaneous metastasis, the factors influencing the number of experimental metastases induced by i.v. injection

of cells may be important in the investigation and treatment of metastatic cells which have succeded in entering the circulation. Experimental metastasis represents the later events in the spontaneous metastatic sequence following escape from the tumor into the circulation.

The immunogenicity of the cell lines, which is heterogeneous, does not appear to have had a major influence on their metastatic capacities. Preliminary results do not indicate any relationship between the immunogenicity and the spontaneous or experimental metastatic activity. The cloned cell line J 9-4/11 was not immunogenic, very tumorigenic ($TD50 < 10^3$), poorly metastasizing after s.c. injection and highly colonizing after i.v. injection. The cell line F 9-4/13 was immunogenic and had a high TD50, but like the line J 9-4/11 was poorly metastatic, and highly colonizing.

Initial observations, show that the sensitivity of these cell lines to natural cell-mediated lysis (NK) is very diverse. The clone F 9-4/6 was resistant to NK lysis and was highly metastatic. However, the line J 9-4/1 was very susceptible to NK cell activity and also highly metastatic. The susceptibility of these cell lines to NK activity may, as shown by Hanna and Fidler (10) correlate with the metastatic capacity, but does not appear to us to be the predominant factor determining the fate of disseminated cells.

The properties required of a cell to escape from a tumor may not be the same as, or entirely compatible with, those required for fixation and survival at the site of metastatic growth. Cell escape from a tumor may require a high enzymatic activity in

order to permit the cells to cross the successive physical barriers separating the tumor cells from the circulation (13, 21, 26). Cells which are to fix themselves in an organ and form a secondary tumor growth may require good adhesive properties (16, 17, 18). It is possible that a cell with a raised enzymatic activity may degrade, rather than adhere to, a potential site of attachment. Also a cell which adheres well to its surrounding matrix would tend to stay *in situ* in the tumor. Such a hypothesis could explain the inverse relationship between the degree of spontaneous metastasis and the degree of experimental metastasis found in this study. Cells with good attachment properties would produce many tumor colonies after i.v. injection, but would tend to stay in place, rather than escape to form metastases, after tumor formation following s.c. injection of cells.

The *in vitro* doubling times and saturation densities were heterogeneous. However they showed no discernible relationship with either the TD50 or the two tumor growth phases. These *in vitro* characteristics do not appear therefore to be of primary significance in predicting *in vivo* growth characteristics.

Unlike Cifone et al. (4) we did not observe any consistent difference of behavior between the clones isolated in liquid medium and those isolated in semi-solid medium.

In conclusion, we have described a tumor model consisting of a series of cloned cell lines showing different metastatic and tumorigenic properties. We have found a tendency towards an inverse relationship between the degree of spontaneous metastasis following s.c. injection. We can now use these cell lines to search for characteristics which correlate with

the different levels of tumorigenecity or spontaneous and experimental metastases found. Experiments have been undertaken to assess the importance of the adhesive properties, fibronectin content, proteolytic activity and resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity of these cells. These characterized cell lines can then be used for the investigation of therapeutic schedules as well as the continued study of tumor biology.

REFERENCES

1. Baniyash, M., Netanel, T. and Witz, I.P., Differences in cell density associated with differences in lung colonizing ability of B16 melanoma cells. Cancer Res., 41 : 433-437, 1981.
2. Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J. and Brattain, D.E., Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. Cancer Res., 41 : 1751-1756, 1981.
3. Chen, T.R., *In situ* detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp. Cell Res., 104 : 255-262, 1977.
4. Cifone, M.A. and Fidler, I.J., Correlation of patterns of anchorage-independent growth with *in vivo* behavior of cells from a murine fibrosarcoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 1039-1043, 1980.
5. Cifone, M.A., Kripke, M.L. and Fidler, I.J., Growth rate and chromosome number of tumor cell lines with different metastatic potential. J. Supramol. Str., 11 : 467-476, 1979.
6. Fidler, I.J., Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. Cancer Res., 35 : 218-224, 1975.
7. Fidler, I., Gersten, D.M. and Hart, I.R., The biology of cancer invasion and metastasis. Advan. Cancer Res., 28 : 149-250, 1978.
8. Fidler, I.J. and Hart, I.R., Biological and experimental consequences of the zonal composition of solid tumors. Cancer Res., 41 : 3266-3267, 1981.
9. Fidler, I.J. and Kripke, M.L., Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor. Science, 197 : 893-895, 1977.

10. Hanna, N. and Fidler, I.J., Relationship between metastatic potential and resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in three murine tumor systems. J. Natl. Cancer Inst., 66 : 1183-1190, 1981.

11. Kripke, M.L., Fidler, I.J. and Gruys, E., Heterogeneity of metastatic potential in cells. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 19 : 213, 1978.

12. Kripke, M.L., Gruys, E. and Fidler, I.J., Metastatic heterogeneity of cells from an ultraviolet light-induced murine fibrosarcoma of recent origin. Cancer Res., 38 : 2962-2967, 1978.

13. Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M. and Shafie, S., Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature (Lond.), 284 : 67-68, 1980.

14. Maat, B. and Hilgaard, P., Anticoagulants and experimental metastases - evaluation of antimetastatic effects in different model systems, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 101 : 275-283, 1981.

15. Montagnier, L., La croissance sélective en gélose de cellules transformées par un virus cancérogène. Pathol. Biol., 14 : 244-251, 1966.

16. Murray, J.C., Liotta, L., Redmond, S.I. and Martin, G.R., Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells *in vitro*. Cancer Res., 40 : 347-351, 1980.

17. Nicholson, G.L., Irimura, T., Gonzalez, R. and Ruoslathi, E., The role of fibronectin in adhesion of metastatic melanoma cells to endothelial cells and their basal lamina. Exp. Cell. Res., 135 : 461-465, 1981.

18. Nicholson, G.L. and Winkelhake, J.L., Organ specificity of blood borne tumour metastasis determined by cell adhesion ? Nature (Lond.), 255 : 230-232, 1975.

19. Nowell, P.C., The clonal evolution of tumor cell populations. Science, 194 : 23-28, 1976.

20. Poste, G., Doll, J. and Fidler, I.J., Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78 : 6226-6230, 1981.

21. Poste, G., Doll, J., Hart, I.R. and Fidler, I.J., *In vitro* selection of murine B16 melanoma variants enhanced tissue-invasive properties. Cancer Res., 40 : 1636-1644, 1980.

22. Poste, G. and Fidler, I.J., The pathogenesis of cancer metastasis . Nature (Lond.), 283 : 139-146, 1980.

23. Prehn, R.T., Analysis of antigenic heterogeneity within individual 3-methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. J. Natl. Cancer Inst., 45 : 1039-1045, 1970.

24. Stackpole, G.W., Distinct lung-colonizing and lung-metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma. Nature (Lond.), 289 : 798-800, 1981.

25. Tsuruo, T. and Fidler, I.J., Differences in drug sensitivity among tumor cells from parental tumors selected variants and spontaneous metastases. Cancer Res. 41 : 3058-3064, 1981.

26. Wang, B.S., McLoughlin, G.A., Richie, J.P. and Mannick, J.A., Correlation of the production of plasminogen activator with tumor metastasis in B16 mouse melanoma cell lines. Cancer Res., 40 : 288-292, 1980.

TABLE 1. THE IN VIVO AND IN VITRO GROWTH CHARACTERISTICS OF THE PARENTAL CELLS AND THE CLONED CELL LINES

	IN VIVO GROWTH			IN VITRO GROWTH	
	TD50 (no of cells)[a]	Duration of the first growth phase (days)[b]	Duration of the second growth phase (days)[b]	Doubling time (hours)[c]	Saturation density (cells/cm^2)[c]
Parental cell line 9-4/0	intermediate	38	34	23	2.3×10^5
Clones					
F 9-4/6	intermediate	47	24	15	2.6×10^5
8	low	37	30	21	1.5×10^5
9	low	53	25	18	2.4×10^5
11	low	45	29	20	1.8×10^5
13	intermediate	76	31	18	3.8×10^5
14	intermediate	40	26	21	3.3×10^5
17	low	35	21	22	1.3×10^5
18	high	93	28	17	1.3×10^5
20	intermediate	60	29	20	1.7×10^5
21	low	47	27	27	1.3×10^5
22	low	43	32	30	0.9×10^5
23	low	32	27	18	2.4×10^5
25	intermediate	44	20	18	2.9×10^5
J 9-4/ 1	high	60	21	13	1.6×10^5
2	high	34	30	17	1.1×10^5
3	intermediate	30	24	21	1.3×10^5
4	high	48	32	26	0.3×10^5
7	low	28	21	21	2.8×10^5
9	intermediate	36	30	21	3.0×10^5
10	intermediate	34	24	21	1.7×10^5
11	low	38	22	19	2.4×10^5

a. The TD50 is the number of cells required for the induction of tumors in 50 % of animals by s.c. injection. These results were divided into 3 groups, low < 1,000, intermediate > 1,000 and < 10,000 and high > 10,000.

b. The first growth phase represents the latency of appearence of a tumor of 15 mm diameter (counted in days from the time injection).The second growth phase is the time required for the growth of a tumor from 15 mm to 30 mm in diameter. The two growth phases were calculated for a dose of 5×10^4 cells injected s.c., from the regressions established for each clone (see example Chart 3).

c. The doubling time and saturation density were calculated from growth curves. Duplicate 60 mm plates were counted every 24 hr. Plates were seeded with 5×10^4 cells.

TABLE 2. EXTENT OF METASTATIC INVASION AT AUTOPSY FOLLOWING S.C. INJECTION OF THE PARENTAL CELLS AND THE CLONED CELL LINES

Cells	Average diameter of tumors mm ± S.E	Number of autopsies	Lung metastases		Percent of animals with ganglionary metastases					% of rats wi mediastinal metastases
			% of rats	mean no./ rat ± S.E.	inguinal ipsolateral	axillary ipsolateral	inguinal contralateral	axillary contralateral	lumbar-aortic	
Parental cells 9-4/0	40 ± 1.7	15	80	9 ± 2.1	73	67	10	0	40	80
Clones										
F 9-4/6	50 ± 1.9	14	100	35 ± 4.3	86	43	14	0	43	77
8	45 ± 1.6	16	80	10 ± 2.6	81	63	19	6	50	40
9	47 ± 1.6	14	100	28 ± 5.9	100	86	36	21	100	29
11	49 ± 2.2	16	100	20 ± 2.3	94	63	6	0	75	25
13	46 ± 2.0	18	94	12 ± 2.3	89	61	6	0	17	22
14	45 ± 1.2	15	93	14 ± 1.8	93	67	7	0	40	47
17	50 ± 1.1	16	100	23 ± 2.1	100	38	19	0	94	56
18	45 ± 1.5	7	86	23 ± 9.7	100	100	43	14	100	14
20	44 ± 2.4	11	82	18 ± 5.5	100	100	36	9	64	27
21	52 ± 1.8	14	100	19 ± 3.1	100	43	14	0	76	36
22	51 ± 1.5	19	90	13 ± 2.9	100	63	11	0	74	21
23	46 ± 1.4	19	100	13 ± 2.0	84	63	53	0	32	42
25	52 ± 1.6	14	86	21 ± 6.1	93	71	43	14	79	21
J 9-4/1	43 ± 3.5	11	100	21 ± 4.3	100	80	10	0	30	82
2	37 ± 1.3	10	90	18 ± 2.2	100	40	0	0	10	0
3	46 ± 1.8	15	100	10 ± 1.8	100	60	0	0	53	0
4	40 ± 3.5	9	88	14 ± 2.5	100	100	44	0	88	44
7	41 ± 1.6	17	88	17 ± 4.0	88	59	12	0	35	12
9	46 ± 1.7	14	93	18 ± 4.5	100	64	7	0	57	24
10	43 ± 1.9	17	88	12 ± 2.7	94	88	0	0	29	18
11	44 ± 1.9	17	94	9 ± 2.3	94	53	0	0	12	24

TABLE 3. INDUCTION OF LUNG COLONIES BY I.V. INJECTION OF PARENTAL AND CLONED CELL LINES[a]

Source of cells		No. of lung colonies Mean ± S.E.	No. of rats with extrapulmonary metastases[d]	p[c]
Parental cell line	(18)[b]	7 ± 3.2		
Clones				
F9-4/8	(10)	1 ± 0.2		NS
9	(10)	7 ± 0.9		NS
18	(10)	4 ± 2.1		NS
21	(10)	4.5 ± 2.2	1 M.	NS
25	(10)	3.5 ± 1.1	1 M.	NS
22	(10)	4 ± 0.9	1 M.	NS
17	(10)	6 ± 1.6	5 M.	NS
11	(9)	6 ± 2.3	1 L.G.	NS
J9-4/1	(9)	4 ± 1.2	3 M. 2 L.G	NS
4	(8)	3 ± 1.4	2 M. 1 L.G	NS
7	(7)	8 ± 5.5	3 M. 1 L.G	NS
9	(9)	6 ± 2.2	7 M. 2 L.G.	NS
2	(10)	19 ± 4.8	9 M. 2 L.G	< 0.05
3	(7)	26 ± 6.7	4 M. 1 L.G	< 0.05
10	(5)	18 ± 9.0	4 M.	< 0.10
11	(9)	14 ± 5.3	4 M. 5 L.G.	< 0.05
F9-4/23	(8)	17 ± 3.1	6 M.	< 0.10
14	(6)	19 ± 2.3	5 M.	< 0.001
6	(10)	18 ± 4.23	8 M.	< 0.05
20	(10)	20 ± 3.9	8 M. 2 intestinal 2 dorsal s.c. 1 thigh s.c.	< 0.02
13	(10)	22 ± 5.9	8 M.	< 0.02

a) 10^5 cells were injected i.v. in the tail vein and the no of lung colonies at the lung surface was counted 10 weeks later.

b) in parentheses the no of rats per group.

c) probability of no difference from parental cells student's t test

d) M.= mediastinal , L.G.= Lumbaraotic Ganglia.

TABLE 4. CORRELATION BETWEEN SPONTANEOUS AND EXPERIMENTAL METASTASES

Correlation between	p^a
Lung metastases and lumbaraortic ganglia metastases (direct)	$p < 0.05$
Experimental lung colonies and lumbaraortic ganglia metastases (inverse)	$p < 0.01$
Experimental lung colonies and lung metastases (inverse)	$p < 0.05$

[a] Correlations were determined using Yates χ^2 test.

CHART 1

Chart 1. Tumor growth curves and the two growth phases of the parental cell line 9-4/O.

A. Growth curves of tumors induced by the s.c. injection of the parental cell lines 9-4/0. The curves represent the mean measurements, for each group, of the tumor diameter in mm. Symbols, represent the injected cell doses ○ - 10^3, ■ - 10^4, △ - 10^5, ▼ - 10^6.

B. The two phases of growth of the tumors induced by 9-4/0, ------ the time taken in days for growth to 15 mm in diameter counted from the injection time, ——— the time taken for growth from 15 to 30 mm . Symbols represent injected cell doses as in 1A .

CHART 2

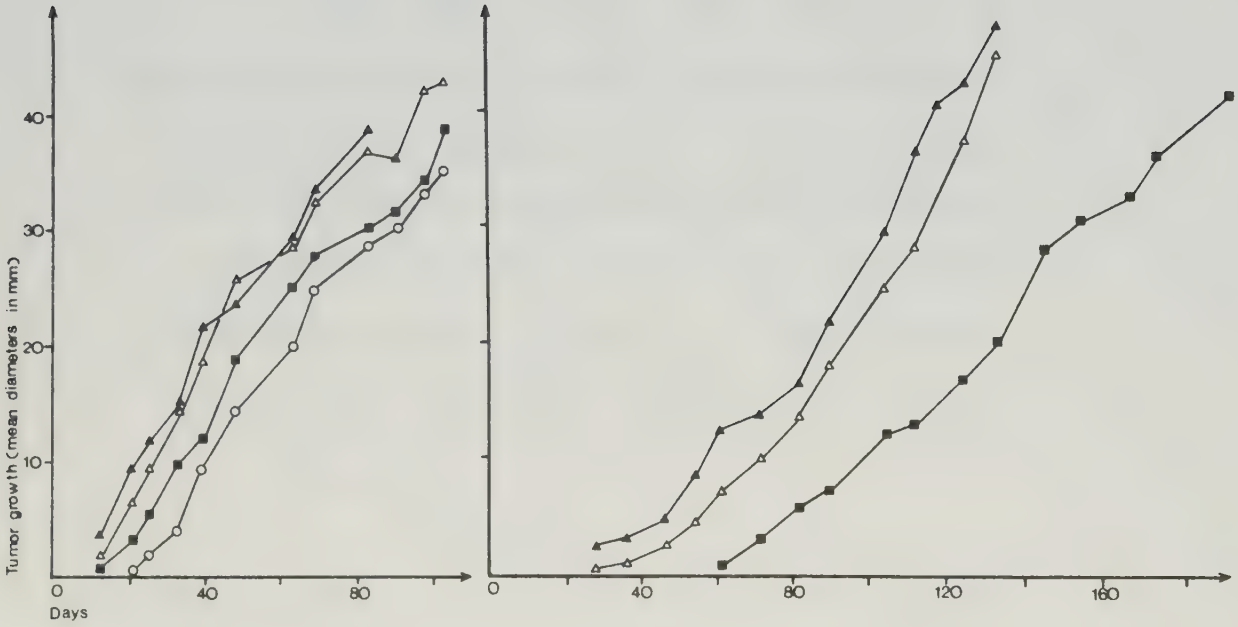

Tumor growth (mean diameters in mm)
40
30
20
10
0
40
80
Days
0
40
80
120
160

Chart 2. Tumor growth curves of two of the cloned cell lines, F 9-4/8 and F 9-4/18.

Growth curves of tumors induced by s.c. injection of the cloned cell lines F 9-4/8, A and F 9-4/18, B. The curves represent the mean measurements, for each group, of the tumor diameter in mm. The symbols represent the injected cell doses, ○ - 10^3, ■ - 10^4; △ - 10^5, ▲ - 10^6.

CHART 3

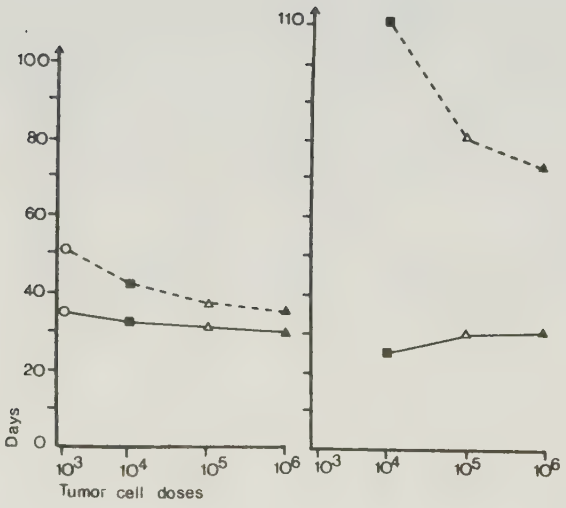

110
100
80
60
40
20
0
Days
10^3
10^4
10^5
10^6
10^3
10^4
10^5
10^6
Tumor cell doses

Chart 3. The two growth phases of two of the cloned cell lines, F 9-4/8 and F 9-4/18.

The two growth phases of the tumors induced by s.c. injection of the cell lines F 9-4/8, A and F 9-4/18, B. ------- the time taken in days for growth from the injection to a diameter of 15 mm, —— the time taken for growth from 15 to 30 mm in diameter. The symbols represent the injected cell doses ○ - 10^3, ■ -10^4, △ -10^5, ▲ - 10^6. The durations of the two growth phases given in Table 1 were calculated, for a theoretical injection dose of 5 x 10^4 cells from regressions established using the points for each cell line such as those illustrated in this chart.